



***Diseño e implementación de estrategias
de control en un biofiltro percolador
anóxico para la desulfuración de
biogás.***

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de
Alimentos

Javier Brito García

Mayo 2017

“Diseño e implementación de estrategias de control en un biofiltro
percolador anóxico para la desulfuración de biogás.”

Memoria presentada por el Ingeniero Químico Javier Brito García para
optar al grado de Doctor por la Universidad de Cádiz.

Fdo.: Javier Brito García

Cádiz, 5 de mayo de 2017

Dr. D. José Manuel Gómez Montes de Oca

Catedrático de Ingeniería Química

Universidad de Cádiz

Dr. D. Martín Muñoz Ramírez

Profesor Ayudante Doctor

Universidad de Cádiz

CERTIFICAN QUE:

La presente memoria titulada ‘**Diseño e implementación de estrategias de control en un biofiltro percolador anóxico para la desulfuración de biogás.**’ presentada por **Javier Brito García**, ha sido realizada bajo nuestra dirección, cumpliendo los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cádiz. Por ello, autorizamos su presentación y defensa públicas.

Fdo.: Dr. D. José Manuel Gómez Montes de Oca

Cádiz, 5 de mayo de 2017

Fdo.: Dr. D. Martín Ramírez Muñoz

Cádiz, 5 de mayo de 2017

The true sign of intelligence is not knowledge but imagination.

Albert Einstein

A mi familia.

RESUMEN

El H_2S es el principal compuesto de azufre reducido presente en el biogás, y aunque su eliminación puede llevarse a cabo mediante el uso de biofiltros percoladores anóxicos, alcanzando altas capacidades de eliminación, la eficiencia del sistema puede verse afectada considerablemente ante perturbaciones que se produzcan en el proceso.

Una de las perturbaciones más comunes que se produce son los cambios en la concentración de entrada de H_2S . El efecto de este cambio sobre el sistema biológico podría mitigarse con la implementación de un sistema de control adecuado. De esta forma, se puede dotar al proceso de una herramienta muy importante ante perturbaciones de tipo externas, además de proporcionar un control preciso en la dosificación del aceptor de electrones. Este último aspecto cobra mayor importancia si el nitrato o nitrito que se emplea no provienen de un proceso biológico.

En el empleo de métodos biológicos para la desulfuración de biogás, y específicamente el uso de biofiltros percoladores, han sido implementadas estrategias de control basadas en el uso del potencial de oxidación-reducción (Fernández *et al.*, 2013; Almenglo *et al.*, 2016), con el objetivo de reducir el consumo de nitrato y/o mantener altos porcentajes de eliminación. No obstante, la implementación de modos de control más complejos, como el control anticipado o el control retroalimentado (controladores P, PI, PID), en biofiltros percoladores, ha sido poco estudiada hasta la fecha.

Esta tesis tiene como objetivo mejorar el rendimiento y disminuir el efecto de perturbaciones en un sistema biológico de desulfuración anóxica, empleando un biofiltro percolador. Se proponen diferentes estrategias de control, con vistas a minimizar el efecto de cambios en la concentración de entrada de H_2S y el caudal de biogás, así como el estudio de cambios del aceptor de electrones sobre el porcentaje de eliminación de H_2S y las poblaciones del sistema.

Para el desarrollo del trabajo experimental, se realizó el diseño, la instalación y la puesta en marcha de un biofiltro percolador anóxico, así como el desarrollo del sistema de control. Este biofiltro a escala de laboratorio tiene un volumen de lecho empaquetado de 2,8 L de anillos Pall, y se alimentó con un efluente gaseoso compuesto de una mezcla de H_2S (concentración de entrada de 700 a 3800 ppm_v) y resto N_2 , a un caudal de 1,1 L min⁻¹, operando en flujo paralelo.

Con respecto al sistema de control, la concentración de salida de H_2S fue la variable controlada y se utilizó el caudal del aceptor de electrones como variable manipulada.

En el control retroalimentado, se utilizaron tres métodos de ajuste de controladores: Ziegler-Nichols, Optimización de Ganancia Integral con sensibilidad limitada (AMIGO) y Oscilación Mantenido. A partir del ajuste realizado, fue seleccionado un controlador PID para el estudio de perturbaciones con la concentración de entrada de H_2S variable. Los resultados indicaron que el control de retroalimentado resultó ser altamente estable y robusto ante las perturbaciones evaluadas.

Mientras se realizaron los sucesivos cambios del aceptor de electrones bajo la acción de un controlador PID, se mantuvo el porcentaje de eliminación de H_2S en un 94%. Y a pesar de que esta variación en las condiciones de operación produjo cambios en la estructura de las poblaciones bacterianas, no tuvo una repercusión negativa en la actividad sulfuro-oxidante del sistema.

Por otro lado, el sistema bajo la acción de un controlador PI, alcanzó altos porcentajes de eliminación (94,0-96,5%), ante la disminución del EBRT desde 117 s hasta 67 s y el aumento de la concentración de H_2S de entrada.

AGRADECIMIENTOS

Haber llegado a este punto ha sido posible por confluencias de hechos y personas. Y alcanzar la meta ha sido gracias a la ayuda y el esfuerzo.

- A mis tutores les debo agradecer la posibilidad de haber realizado este trabajo, su paciencia, el tiempo que me han dedicado, sus buenas ideas y mejores enseñanzas, y por ser humanos, ante todo. Por todas estas cosas y otras que me llevo dentro. Gracias: Dr. Domingo Cantero Moreno, Dr. José Manuel Gómez Montes de Oca y Dr. Martín Ramírez Muñoz, mi paradigma en Ingeniería Química.
- Al Proyecto Europeo NOO2, y la ilusión que provocó en mí.
- Que pensaras en mi nombre en el momento exacto me permitió volver a soñar con mi carrera, hacer algo otra vez desde el punto de vista profesional y fue volver a una vida que ya daba por vivida. Por todo esto y una sincera amistad. Gracias: Maikel-Ceci-Angelote.
- Sois un buen equipo. Con el que se comparte excelentes reuniones, ideas y muy buenos momentos en épocas navideñas. Gracias: Grupo Tep 105. Gema, Elena, Zamira, Jorge, Patricio, Luis, José y Emilio por vuestra ayuda. Fernando: por todo lo que he aprendido y has hecho posible. Antonio: por tu implicación y tu dedicación.
- A la familia que abrió puertas. Gracias: Anita y Pedrito.
- A quien, sin conocerme, hizo el dichoso papel. Gracias: Miguel.
- Me acogiste, me has hecho sentir muchas veces como en casa, otras me has puesto a prueba, te he dado y he recibido. Gracias: Cádiz-Andalucía-España.
- Fuisteis soporte en momentos difíciles, y no solo eso, también son de los míos en este país. Gracias: Familia de Pepi y Paco.
- A la familia de José María y María. Gracias por vuestro apoyo.
- Les conocí en mi época más medieval y oscura, y agradezco mucho toda la ayuda que me dieron y los buenos momentos vividos. Gracias: Zoo de ingeniería. Belenchu, Xio y Pau.
- A los compañeros del Dpto. A Nela, Juanito, Beli y Cefe. Gracias: porque nunca hubo un "no".

- Al universo becario del Dpto. Kaoutar, Benjumea, Alvaro, Fini, Nacho y Antonio, también a Ana. Gracias: por los buenos momentos y porque me sentí uno más entre ustedes.
- A los que pasaron por la UCA, pero se quedaron conmigo. Gracias: Isa, Rubén y Javi.
- Fue inesperado y muy grato conocerles. De repente vuelvo a revivir momentos muy parecidos a los vividos con mi familia cubana. Por vuestro apoyo. Gracias: Familia de Cris.
- Me viste nacer, me moldeaste a tu forma, y crecí contigo. Gracias: Cuba.
- Gracias: Amigos de Cuba y de España. Almu, Lolita y la gran familia de Córdoba.
- Por ese vínculo a prueba de distancia, a prueba de sal, de agua y de letras que no escribo. Gracias a mis tíos, a mis primos y la familia de Yeni.
- Mis guardianes. Gracias: Hermano, Marjo y mis lind@s sobrin@s.
- Porque están siempre conmigo. Gracias: Papi y mami.
- Porque giro alrededor de un sol. Gracias: Cris.

ÍNDICE

RESUMEN	i
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE.....	xv
Lista de figuras	xiv
Lista de tablas	xxi
ACRÓNIMOS	xxv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	7
2.1 Producción de biogás y usos.	7
2.2 Métodos biológicos de desulfuración del biogás.	9
2.2.1 Biodesulfuración aerobia.	11
2.2.2 Biodesulfuración anóxica.	14
2.2.2.1 Procesos anóxicos con nitrato.	14
2.2.2.2 Procesos anóxicos con nitrito.	18
2.2.3 Biofiltración anóxica vs. aerobia.	22
2.3 Microbiología de las poblaciones.	25
2.4 Sistemas de control.	28
2.4.1 Control retroalimentado.	29
2.4.1.1 Control <i>On-Off</i> .	31
2.4.1.2 Control Proporcional (P).	32
2.4.1.3 Control Proporcional Integral (PI).	32
2.4.1.4 Control Proporcional Integral Derivativo (PID).	33
2.4.2 Control anticipado.	35
2.4.3 Anticipado-retroalimentado.	37
2.5 Métodos de ajuste de controladores.	38
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
3.1 Biofiltro percolador anóxico.	41
3.1.1 Medio mineral.	45

3.1.2 Inoculación.	45
3.2 Sistema de control.	49
3.2.1 Arquitectura de programación en LabVIEW®.	50
3.3 Ajuste y selección de controladores.	52
3.3.1 Ajuste de controladores. Entrada en escalón.	52
3.3.2 Ajuste de controladores. Oscilación mantenida.	54
3.3.3 Criterios de selección de controladores.	56
3.3.3.1 Criterios basados en el tiempo integral.	56
3.3.3.2 Criterios basados en la evaluación de la respuesta del sistema.	57
3.4 Cambios del aceptor de electrones.	57
3.4.1 Cambio de nitrato a nitrito. Periodo (I).	58
3.4.2 Cambio de nitrito a nitrato. Periodo (II).	58
3.4.3 Cambio de nitrato a nitrito. Periodo (III).	59
3.5 Estrategias de control.	59
3.5.1 Control anticipado.	63
3.5.2 Control retroalimentado. Perturbaciones.	64
3.5.3 Control retroalimentado por ORP.	66
3.5.4 Cambios en el tiempo de residencia.	66
3.6 Estudios de biología molecular.	67
3.6.1 Proceso de toma de muestras.	67
3.6.2 Extracción de ADN.	69
3.6.3 Análisis DGGE de los productos de PCR y extracción de ADN.	69
3.6.4 Análisis del perfil de bandas del ADNr 16S de la comunidad microbiana.	70
3.7 Métodos analíticos.	72
3.7.1 Análisis de muestras líquidas.	72

3.7.2 Análisis de muestras gaseosas.	72
3.7.3 Determinación de la concentración celular.	74
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	75
4.1 Configuración y arranque del sistema experimental.	77
4.2 Ajustes de controladores.	83
4.2.1 Lazo cerrado. Método de la oscilación mantenida.	83
4.2.2 Lazo abierto. Método del escalón.	87
4.2.3 Criterios de selección de controladores.	91
4.3 Cambios del aceptor de electrones.	101
4.4 Estrategias de control analizadas.	108
4.4.1 Control anticipado.	108
4.4.2 Control retroalimentado.	116
4.4.2.1 Escalón y pico.	117
4.4.2.2 Función escalera sinusoidal.	121
4.4.2.3 Función escalera.	124
4.4.2.4 Cambios del <i>set point</i> .	131
4.4.2.5 Función escalera para controladores con ajuste del día 445.	133
4.4.2.6 Control ORP.	134
4.5 Respuesta del sistema de control ante cambios del tiempo de residencia.	142
4.6 Estudio de la dinámica poblacional durante los cambios del aceptor de electrones.	144
4.6.1 Estudio microbiológico de las poblaciones.	144
4.6.2 Identificación de unidades taxonómicas operativas.	153
CONCLUSIONES.....	155
ANEXOS.....	159
REFERENCIAS.....	175

Lista de figuras

Figura 1. Vínculos entre los componentes macroscópicos y respuesta de las comunidades (Cabrol y Malhautier, 2011).	26
Figura 2. Esquema general del control retroalimentado.	29
Figura 3. Diagrama de bloque del control anticipado (Levine, 1996).	36
Figura 4. Diagrama de bloques del control anticipado - retroalimentado.	37
Figura 5. Modos de operación del BTF.	42
Figura 6. Esquema detallado del sistema de biofiltración.	44
Figura 7. Respuesta ante entrada en escalón y procedimiento para determinar los parámetros K, L y T.	53
Figura 8. Respuesta de un sistema de control proporcional, para el aumento progresivo de la ganancia proporcional.	55
Figura 9. Perturbaciones realizadas para la carga y concentración de entrada de H ₂ S.	62
Figura 10. Esquema de la estrategia de control anticipado.	64
Figura 11. Esquema del sistema de medición en la corriente gaseosa de H ₂ S.	73
Figura 12. Elementos fundamentales de la instalación experimental.	78
Figura 13. Evolución del BTF durante las primeras 24 h de inoculación (Almenglo <i>et al.</i> , 2016).	79
Figura 14. Concentración de H ₂ S _{out} y ORP durante la dosificación por valor de ORP en la operación con nitrato en la etapa de inoculación.	79
Figura 15. Lechos superiores y biomasa inmovilizada.	81
Figura 16. Oscilación mantenida para el sistema operando con nitrato. Ajustes del día 177 y día 393.	84
Figura 17. Oscilación mantenida para el sistema operando con nitrito. Ajustes del día 311 y día 445.	86
Figura 18. Variación de concentraciones de H ₂ S a la salida y entrada para el ajuste por el método del escalón. Ajustes del día 177 y del día 445.	89

Figura 19. Ajuste del día 144. Operación con nitrato Sistema sin control.	91
Figura 20. Ajuste del día 144. Operación con nitrato. AMIGO.	92
Figura 21. Ajuste del día 144. Operación con nitrato. Oscilación mantenida.	93
Figura 22. Ajuste del día 144. Operación con nitrato. Ziegler-Nichols.	95
Figura 23. Perturbación en escalón para controladores del ajuste del día 445. Operación con nitrito.	99
Figura 24. Selectividad de sulfato en función de la ratio $N:S_{\text{eliminado}}$ durante los tres cambios del aceptor de electrones.	104
Figura 25. Comportamiento de la ratio $N:S_{\text{eliminado}}$, durante los tres cambios del aceptor de electrones.	105
Figura 26. Comparativa de selectividad de sulfato vs. ratio $N-NO_3^-:S_{\text{eliminado}}$. Regresión lineal.	111
Figura 27. Selectividad a sulfato para la estrategia con y sin control anticipado.	113
Figura 28. Concentración de H_2S_{out} . Operación con nitrato y nitrito.	115
Figura 29. Perturbaciones en la operación con nitrato. Escalón y pico.	118
Figura 30. Perturbaciones en la operación con nitrito. Escalón y pico.	120
Figura 31. Perturbación escalera sinusoidal. Operación con nitrato.	122
Figura 32. Perturbación escalera sinusoidal. Operación con nitrito.	124
Figura 33. Perturbación escalera. Operación con nitrato.	126
Figura 34. Selectividad de sulfato para experimentos con y sin control retroalimentado. Operación con nitrato	127
Figura 35. Perturbación escalera. Operación con nitrito.	128
Figura 36. Selectividad de sulfato para experimentos con y sin control retroalimentado. Operación con nitrito.	129

Figura 37. Respuesta del sistema de control ante cambios del <i>set point</i> . Operación con nitrato y nitrito.	132
Figura 38. Perturbación escalera para controladores seleccionados por criterios de tiempo integral.	134
Figura 39. Barrido de ORP. Operación con nitrato y nitrito.	137
Figura 40. Control por ORP para set point de -340 mV. Operación con nitrato y nitrito.	138
Figura 41. Control por ORP para set point de -360 mV. Operación con nitrato y nitrito.	141
Figura 42. Cambios de EBRT.	143
Figura 43. Dendograma y gel DGGE para muestras del periodo I.	145
Figura 44. Índices de Simpson y Shannon-Wiener para muestras del periodo I.	147
Figura 45. Gel DGGE con muestras de los tres periodos de cambio del aceptor de electrones realizados.	149
Figura 46. Dendograma de resultados del gel DGGE para los tres periodos de cambio del aceptor de electrones realizados	151
Figura 47. Índices de Simpson y Shannon-Wiener para muestras de los tres periodos de cambio del aceptor de electrones realizados	152

Lista de tablas

Tabla 1 Aplicaciones más comunes del biogás y concentraciones permisivas de H ₂ S.	8
Tabla 2 Parámetros de operación y diseño para la eliminación de H ₂ S en sistemas aerobios. Comparación entre estudios realizados en BTFs.	13
Tabla 3 Parámetros de operación y diseño para la eliminación de H ₂ S en sistemas anóxicos. Comparación entre estudios realizados en BTFs operados con nitrato.	17
Tabla 4 Ventajas y desventajas de los biofiltros percoladores anóxicos y aerobios.	24
Tabla 5 Especificaciones técnicas del soporte empleado en el BTF.	43
Tabla 6 Resumen de experimentos y condiciones de operación.	47
Tabla 7 Cálculos de parámetros de controladores por método de entrada en escalón.	54
Tabla 8 Cálculos de parámetros de controladores por método de oscilación mantenida.	55
Tabla 9 Condiciones experimentales para la operación del BTF con nitrato y nitrito. Experimentos con y sin control anticipado.	63
Tabla 10 Muestras biológicas tomadas.	68
Tabla 11 Valores de biomasa inmovilizada para BTFs anóxicos.	82
Tabla 12 Parámetros para los ajustes por oscilación mantenida.	85
Tabla 13 Constante de controladores calculadas a partir de los resultados de la oscilación mantenida.	87
Tabla 14 Constantes de los controladores. Ajustes de los días 177 y día 445.	90
Tabla 15 Criterios de errores calculados a partir del ajuste del día 177.	96
Tabla 16 Parámetros para selección de controladores.	96
Tabla 17 Errores calculados a partir del ajuste del día 445.	98
Tabla 18 Características de la respuesta ante entrada en escalón para los controladores ajustados por ajuste del día 445.	100

Tabla 19 Constantes de los controladores PID empleados en los cambios del aceptor de electrones.	101
Tabla 20 Resultados experimentales para los cambios del aceptor de electrones con controladores PID.	102
Tabla 21 Ratios molares teóricas para la operación con nitrato y nitrito.	106
Tabla 22 Selectividad de sulfato para los experimentos con control anticipado y sin control. Operación con nitrato y nitrito.	109
Tabla 23 Comparativa para el control anticipado. Operación con nitrato y nitrito.	116
Tabla 24 Comparativa para el control retroalimentado. Operación con nitrato y nitrito.	130
Tabla 25 Muestras incluidas en el DGGE de lo tres periodos de cambio del aceptor de electrones realizados	150

ACRÓNIMOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ASO: Oxidación anóxica de sulfuro

BTF: Biofiltro percolador

DGGE: Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante

EBRT: Tiempo de residencia de lecho vacío

EC: Capacidad de eliminación

EDAR: Estación depuradora de aguas residuales

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

FIA: Análisis por inyección de flujo

FISH: Hibridación fluorescente *in situ*

FNA: Ácido nitroso libre

GHG: Gases de efecto invernadero

H: Índice de Shannon-Wiener

HD-QPAC: Medio de coalescencia (polipropileno de alta densidad)

HRAP: Lagunas de alta carga

IL: Carga de alimentación

k_d : Ganancia derivativa

k_i : Ganancia integral

k_p : Ganancia proporcional

K_U : Última ganancia para oscilación mantenida

MV: Variable manipulada

NO_x-N: Óxidos de nitrógeno

OM: Oscilación mantenida

OPUF: Espuma de poliuretano de poro abierto

OTU: Unidades taxonómicas operativas

ORP: Potencial de oxidación-reducción

P: Controlador proporcional

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFPD: Detector fotométrico de pulsos

PI: Controlador proporcional-integral

PID: Controlador proporcional-integral-derivativo

PV: Variable controlada

PVC: Policloruro de vinilo

RE: Porcentaje de eliminación

S: Índice de dominancia de Simpson

SOB: Bacterias sulfuro-oxidantes

SOFC: Pila de combustible de óxido sólido

SO_x: Óxidos de azufre

VSS: Sólidos suspendidos volátiles

τ_I : Tiempo integral

TCD: Detector de conductividad térmica

τ_D : Tiempo derivativo

TLV: Velocidad superficial del líquido de recirculación

T_U: Período de la oscilación mantenida

UASB: Reactor anaerobio de flujo ascendente con manto de lodos

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de las principales actividades humanas, ha estado siempre asociado al uso de la energía. Esa misma energía ha permitido la supervivencia de la especie, facilitando la transformación del medio que le rodea, así como alcanzar niveles superiores del conocimiento en períodos relativamente cortos de tiempo.

En la actualidad, resulta imperativo, el desarrollo de modelos sostenibles en todos los campos de la actividad humana, y debido a la incesante demanda, la energía y el medio ambiente deben ir de la mano (Abatzoglou y Boivin, 2009). A ello hay que sumar los límites de la explotación energética de los combustibles fósiles, cada vez más cerca, debido al constante crecimiento de la población mundial y sus necesidades energéticas (Stambouli y Traversa, 2002).

La transición de las fuentes convencionales de energía hacia las energías renovables pasa por el desarrollo de alternativas económicamente viables (Lisserre et al., 2010), y en este sentido, juegan un papel fundamental los procesos basados en sistemas biológicos (biomasa, biohidrógeno, biogás, etc.). Determinados procesos de adecuación, tratan de reducir las limitaciones de estas fuentes alternativas de energía y hacer viable su integración a los sistemas de distribución y consumo ya establecidos.

En el caso particular del biogás, no solo son importantes las técnicas para incrementar el contenido de CH₄ en el mismo, y con ello su valor energético, sino también las que se encargan de reducir o eliminar determinados compuestos considerados contaminantes. Entre estos compuestos contaminantes destaca el H₂S, que es considerado el más indeseado y con mayor repercusión en las aplicaciones del biogás (Kadam y Panwar, 2017), principalmente por su alto poder corrosivo en presencia del agua y por la emisión de óxidos de azufre de elevada toxicidad, productos de la combustión.

En los métodos de desulfuración del biogás, los aspectos técnicos y económicos, juegan un papel fundamental en la elección del proceso más adecuado. De ahí que los métodos físico-químicos (Yentekakis y Goula, 2017), se estén viendo relegados a un segundo plano debido a las ventajas que presentan los métodos biológicos, principalmente las altas eficiencias de eliminación que se alcanzan en los mismos (Muñoz et al., 2015). En particular, la biodesulfuración anóxica, que es llevada a cabo por bacterias

autótrofas desnitrificantes, puede emplear tanto nitrato como nitrito como aceptores finales de electrones (Pokorna y Zabranska, 2015), pudiéndose utilizar aguas residuales con presencia de ambos compuestos y reduciendo los consumos asociados a esta tecnología.

Es precisamente en el ámbito de la reducción de costes, donde la implementación de sistemas de control puede ser una potente herramienta, así como en la mejora de la eficiencia del proceso en sí y su escalado (Faure et al., 2001). A pesar de las incertidumbres que se presentan en los procesos biológicos, debido a la dinámica de estos sistemas y la variabilidad entre individuos que los conforman (Mendonça y Lago, 1998), las estrategias de control aplicadas a estos procesos, han dado respuestas robustas (Yi et al., 2000), e incluso han logrado la estabilización de sistemas complejos (Park et al., 1998).

Sobre la base de los aspectos expuestos anteriormente, y entendiendo la necesidad e implicación que tiene la biodesulfuración del biogás, el grupo de investigación ‘Reactores Biológicos y Enzimáticos (TEP-105)’ de la Universidad de Cádiz, ha desarrollado la línea de investigación “Biodesulfuración y biofiltración de efluentes gaseosos”, con el objetivo de proponer alternativas tecnológicas viables para la reducción de contaminantes en efluentes gaseosos. Así, el trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral está enmarcado dentro del proyecto:

“Monitorización, modelización y control para la optimización de biofiltros percoladores de desulfuración anóxicos y aerobios” (CTM2012-37927-C03/FEDER).

El objetivo general de la tesis es mejorar el rendimiento y disminuir el efecto de las perturbaciones en biofiltros percoladores anóxicos. La consecución del objetivo general se llevó a cabo a través del conjunto de objetivos específicos que se detallan a continuación:

- Implementación de estrategias de control en biofiltros percoladores anóxicos.
- Estudio de cambios de aceptores de electrones.
- Análisis del consorcio microbiano del biofiltro percolador anóxico.

2. ANTECEDENTES

2.1 Producción de biogás y usos.

Las fuentes de energía renovables están llamadas a jugar un papel fundamental en la obtención de energía eléctrica y/o calor con una menor huella de carbono. Entre las más importantes encontramos la energía solar, la energía eólica, el biogás, la biomasa, la hidroeléctrica y la energía geotermal (Poizot *et al.*, 2011).

De entre todas estas fuentes de energía renovables, el biogás tiene la particularidad de que es obtenido a partir de reacciones de biodegradación, en condiciones anaerobias de residuos orgánicos (Nallathambi *et al.*, 1997). Al ser muchos de estos residuos originados por el hombre, el proceso de obtención de biogás se convierte, en sí mismo, en un método eficaz para el tratamiento y la eliminación de grandes cantidades de residuos orgánicos municipales, industriales y agrícolas, perjudiciales al medio ambiente (Chynoweth *et al.*, 2001); eliminándose o reduciéndose, de esta forma, el impacto de los mismos.

El uso del biogás ayuda a reducir los gases de efecto invernadero (GHG) dado que el CH₄, componente mayoritario del biogás, tiene un efecto invernadero veinticinco veces mayor que el del CO₂ (Kasimir-Klemedtsson *et al.*, 1997). Para aumentar su aprovechamiento en el ámbito europeo se llevan a cabo políticas pioneras a nivel mundial. Un ejemplo es la directiva 2009/28/EC de la Unión Europea, dirigida a todos los estados miembros, que establece como objetivos para el año 2020, que el 20% del consumo total energía en la región sea a partir de fuentes renovables y, específicamente, el 10% del consumo en el sector del transporte provenga de dichas fuentes.

La composición del biogás depende principalmente del tipo de sustrato empleado y del sistema de digestión anaerobia, siendo la concentración de los compuestos mayoritarios: entre 35-70% para el CH₄ y el 15-50% de CO₂ (Muñoz *et al.*, 2015). Esta alta concentración de CH₄ sustenta el uso del biogás como fuente de energía renovable y, en dependencia del uso al que este destinado el biogás, determinará los niveles de concentración tolerables de los contaminantes presentes en él. Su uso

más común es la combustión directa en motores de cogeneración para la producción de electricidad y/o calor (Seadi *et al.*, 2009). Así, la presencia de impurezas tales como compuestos reducidos de azufre, amoníaco y siloxanos reducen las posibilidades de utilización de este importante recurso.

Entre los contaminantes, el sulfuro de hidrógeno (H_2S), cuya concentración en el biogás oscila entre 0,01-2,00% v/v, puede ser considerado de los más perjudiciales, siendo su eliminación o reducción de carácter obligatorio para la mayoría de las aplicaciones relacionadas con el aprovechamiento energético del biogás, debido a que es muy corrosivo, muy nocivo para la salud y su combustión genera óxidos de azufre (SO_x) (Bessou *et al.*, 2011), que son los compuestos responsables de la lluvia ácida. Una vez eliminados los compuestos minoritarios del biogás, se puede disponer de un biogás apto para un amplio espectro de aplicaciones (Weiland, 2003).

La tabla 1 muestra las aplicaciones más comunes del biogás y el límite de concentración de H_2S permitida para cada una de estas tecnologías (Ramírez *et al.*, 2015; Walsh *et al.*, 1989; Weiland, 2003; Petersson y Wellinger, 2009; Allegue *et al.*, 2012; Wellinger, 1999).

Tabla 1 Aplicaciones más comunes del biogás y concentraciones permisivas de H_2S .

Usos del biogás	H_2S (ppmv)
Calefacción (calderas)	<1000
Cogeneración	<500
Combustible para vehículos	< 10
Inyección a redes de gas natural	<4
Celdas de combustible	0,1-50

Aunque los límites de concentración de H_2S establecidos para el uso del biogás depende de la normativa específica de cada país, existe consenso en que la concentración de H_2S a niveles superiores a 300-500 ppmv, provoca serios daños en la mayoría de las tecnologías actuales de aprovechamiento energético (Schieder *et al.*, 2003), siendo la corrosión en los motores de combustión e intercambiadores de calor de los problemas más comunes (Tóth *et al.*, 2015; Aguilera y Gutiérrez, 2016).

Actualmente se desarrollan numerosos estudios hacia la integración de tecnologías para la mejora de la calidad del biogás. Han sido desarrollados modelos de pretratamientos, donde se reducen considerablemente la concentración de los principales contaminantes, seguidos de tratamientos secundarios más sencillos y menos costosos que permiten ampliar los usos del biogás (Trogisch *et al.*, 2005). Así pues, el trabajo realizado por Papurello *et al.* (2014) es un buen ejemplo de estos estudios. Estos autores alimentaron una pila de combustible de óxido sólido (SOFC), con biogás sintético y una concentración de 30 ppm_v de H₂S, que previamente ha sido tratado mediante un proceso simple de adsorción con zeolita y tras 250 horas de tratamiento, apenas hubo registros de la concentración de salida de H₂S (0,07 ppm_v). Con un objetivo similar, el sistema descrito por de Arespacochaga *et al.* (2014a) demostró que la integración de tecnologías de depuración de biogás y celdas de combustible, es técnicamente posible a nivel de planta piloto. En este sistema se integró un pretratamiento con un biofiltro percolador (BTF) aerobio que operó a condiciones ácidas con pH de 1,5, y donde se alcanzó un porcentaje de eliminación de H₂S (RE) de entre 45-90%, con otro sistema múltiple para incrementar la eliminación de este y otros contaminantes como siloxanos, H₂O, etc. Esta configuración múltiple constaba de tres etapas: adsorción en filtros de Fe³⁺, secado y adsorción con carbón activo y la concentración de H₂S en el biogás de entrada fue de 104-1852 ppm_v. Tras sucesivos ciclos de tratamiento se logró reducir la concentración de H₂S a valores inferiores a 0,5 ppm_v, equivalente a porcentajes de eliminación (RE) superiores al 99%, así como la reducción de la humedad absoluta y el contenido de siloxanos, en un 30% y entre 98-100%, respectivamente.

2.2 Métodos biológicos de desulfuración del biogás.

En particular, la desulfuración de biogás se puede realizar mediante técnicas físico-químicas convencionales (adsorción con carbón activado,

torres de lavado químico, precipitación, etc.) (Ryckebosch *et al.*, 2011) o por técnicas biológicas, entre las que destacan el uso de biolavadores (Shell-Paques THIOPAQ®) y los biofiltros percoladores (Ramírez *et al.*, 2015; Deshusses, 1997).

Al comparar los métodos físico-químicos convencionales con las tecnologías biológicas que mayor aplicación tienen en la purificación de gases residuales, se observa que estos últimos destacan por su alta eficacia, el ahorro en costes económicos, la menor generación de subproductos o residuos y una alta aceptación desde el punto de vista ambiental (Estrada *et al.*, 2012).

Los métodos biológicos para desulfuración surgen inicialmente como técnicas de eliminación de olores (McNevin *et al.*, 2000; Lebrero *et al.*, 2011), y progresivamente fue ampliándose su uso hacia métodos más eficaces en la eliminación de altas concentraciones de H₂S presentes en el biogás.

Entre estas técnicas biológicas encontramos los sistemas con micro-aireación de lodos activos (Ramos *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2011; Jeníček *et al.*, 2017), los cuales realizan la oxidación del H₂S directamente en los digestores anaerobios, sin necesidad de unidades externas de tratamiento del biogás. Estos sistemas aprovechan la presencia de algunas especies de bacterias sulfuro-oxidantes (SOB) en los procesos de digestión anaerobia, lo cual permite que ocurran simultáneamente, tanto la producción de metano como la eliminación de H₂S (Tang *et al.*, 2009).

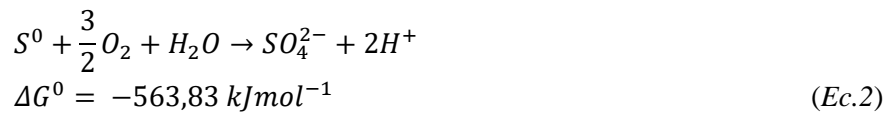
De igual forma, han sido desarrollados fotobiorreactores para la eliminación de H₂S. Así encontramos, por ejemplo, el sistema de lagunas de alta carga (HRAP) acoplado a una columna de absorción para la eliminación simultánea de H₂S y CO₂, (Bahr *et al.*, 2014; Serejo *et al.*, 2015). Estos autores usaron un consorcio de bacterias y microalgas, logrando alcanzar un 100% y un 80% de eliminación de H₂S y CO₂, respectivamente, trabajando a una concentración de entrada de 5000 ppm_v.

No obstante, los sistemas biológicos más empleados en la desulfuración de gases son generalmente reactores de dos fases (gas-líquido), en los cuales la biomasa está en suspensión en el medio líquido del biorreactor, o reactores de tres fases (gas-líquido-biopelícula) en los que la biomasa forma parte de una biopelícula adherida a un soporte sólido (Ramírez *et al.*, 2011).

Específicamente, los BTFs para la desulfuración de biogás han alcanzado su mayor grado de desarrollo en la última década. Y aunque existen diversas clasificaciones, la categorización más empleada es atendiendo al aceptor de electrones con el que operan. De esta forma, han sido clasificados en aerobios, los cuales obtienen la energía necesaria empleando el oxígeno como aceptor de electrones, o anóxicos donde la oxidación del H_2S se realiza empleando nitrato y/o nitrito como aceptores finales de electrones.

2.2.1 Biodesulfuración aerobia.

Como previamente se ha mencionado, este proceso tiene lugar cuando es el oxígeno el aceptor final de electrones. Es llevado a cabo por SOB, y las ecuaciones globales que describen este proceso de oxidación (Madigan *et al.*, 2015), son:



Cuando la disponibilidad del aceptor de electrones es elevada, ambas ecuaciones ocurren en secuencia resultando ser la oxidación completa (Ec.2), pero en caso de bajas concentraciones de oxígeno disuelto o altas concentraciones de sulfuro, se favorece la oxidación parcial (Ec.1), y por ende, la producción de azufre elemental (Janssen *et al.*, 1998).

Es precisamente en la disponibilidad del oxígeno disuelto necesario para llevar a cabo la oxidación del H_2S , donde radica la principal limitación de estos sistemas, dado la baja solubilidad del oxígeno (Sander, 1999). Esta limitación trae consigo problemas de transferencia de materia, lo cual causa obstrucciones en el interior del BTF debido a la acumulación de

azufre elemental, y por tanto repercute en la disminución de la eficiencia de operación del equipo. No obstante, a pesar de la limitación en la solubilidad del oxígeno, los biofiltros percoladores aerobios han demostrado ser muy eficaces (Tabla 2), y cuentan con la gran ventaja del bajo coste de suministro dado que lo usual es usar aire como fuente de oxígeno.

Las investigaciones llevadas a cabo en BTFs aerobios ponen de manifiesto la versatilidad de esta tecnología. Estos sistemas, han demostrado la efectividad del uso de diferentes materiales de soporte como anillos metálicos y de polipropileno o fibras vegetales; lográndose altos porcentajes de eliminación, tanto a escala de laboratorio como en escala industrial (Tabla 2).

Un aspecto significativo a destacar es el amplio rango del pH de trabajo. Específicamente este parámetro puede ser usado para seleccionar determinados tipos de microorganismos en el sistema de oxidación de H_2S (Charnnok *et al.*, 2013). En este mismo sentido, se han llevado a cabo estudios con biofiltros percoladores operando a pH ácido, y se identificaron bacterias del género *Acidithiobacillus* (*Acidithiobacillus Thiooxidans* AZ11) (Lee *et al.*, 2006), así como BTFs en operación a valores de pH más cercanos a la neutralidad, entre 5,5 y 7,5. En este caso las bacterias identificadas pertenecían al género *Thiobacillus* (Aroca *et al.*, 2007).

Como se ha mencionada antes, la transferencia de oxígeno es un aspecto fundamental en esta tecnología, y precisamente, en la mejora de la disponibilidad de oxígeno disuelto se han centrado numerosas investigaciones. Tal es el caso del trabajo realizado por Rodríguez *et al.* (2012), donde se comparó la eficacia de tres dispositivos en la transferencia de oxígeno desde la fase gas al líquido. Estos dispositivos fueron: un difusor, un ejector venturi y un jet-venturi. Los autores llegaron a la conclusión de que este último fue el que presentó los mejores resultados en cuanto a la cantidad de oxígeno trasferido por energía consumida ($4,1-4,8 \text{ kgO}_2 \text{ kW}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Por lo que el uso de este dispositivo significó un aumento entre el 84-88% de este parámetro respecto al resultado alcanzado con el difusor, y de un 22-24% respecto al uso del ejector venturi.

Tabla 2 Parámetros de operación y diseño para la eliminación de H₂S en sistemas aerobios. Comparación entre estudios realizados en BTFs.

Material de relleno	EBRT (min)	Volumen de lecho (L)	pH	EC _{max} (gS m ⁻³ h ⁻¹)	TLV (m h ⁻¹)	Referencia
Anillos de polipropileno	3,8-5,9	5150,0	1,7	50,8±12,2 (RE 99%)	5,0	(Rodríguez <i>et al.</i> , 2014)
HD-QPAC®	3,0	2,0	6,5-7,0	51,8 (RE 99%)	3,6	(Maestre <i>et al.</i> , 2010)
Anillos plásticos y Fibras de coco	3,0	0,5	0,5-4,0	141,5 (RE 97%)	4,7	(Charnnok <i>et al.</i> , 2013)
HD-QPAC®	2,0-3,0	2,0	6,0-6,5	55,0-82,0 (RE 98%)	3,8	(Fortuny <i>et al.</i> , 2011)
Anillos plásticos	3,0	12000,0	2,7	160,0 (RE 99%)	2,0-10,0	(Tomàs <i>et al.</i> , 2009)
Anillos metálicos	3,0	2,0	6,0-6,5	100,0 (RE 94%)	7,0	(Montebello <i>et al.</i> , 2012)

La conclusión anterior fue corroborada en los estudios realizados por Rodríguez et al. (2014). En la operación de un BTF aerobio a escala industrial donde se llevó a cabo la sustitución de un aireador convencional por un jet-venturi. Tras esta modificación, se alcanzó un incremento significativo de la concentración de oxígeno disuelto del 200% ($2,8 \text{ mg L}^{-1}$), reduciendo considerablemente el caudal de aire de $22,1 \pm 5,7$ a $5,6 \pm 3,8 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$.

No solo la mejora de factores externos del sistema repercute en el aumento de la solubilidad del oxígeno, otros aspectos propios de la operación de los BTF tienen una relación directa con este parámetro. Recientemente, López *et al.* (2016) han evaluado la velocidad superficial del líquido (TLV) y el modelo de flujo en un BTF aerobio. Tras realizar una comparación del sistema con y sin regulación de la TLV, llegaron a la conclusión de que la variación del TLV entre $4,4$ - $18,9 \text{ m h}^{-1}$, resultó en una mejora del 10% de la capacidad de eliminación del sistema (de $237,0$ a $262,7 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) y un incremento de hasta un 9% de la selectividad de sulfato, operando a una carga de entrada de $283,8 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

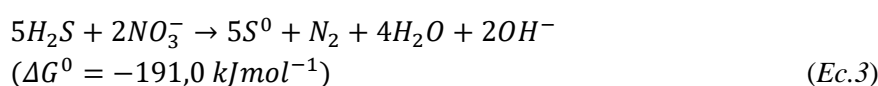
2.2.2 Biodesulfuración anóxica.

2.2.2.1 Procesos anóxicos con nitrato.

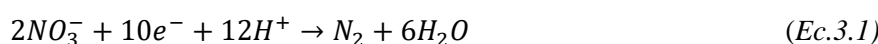
Mientras que en los sistemas aerobios el aceptor final de electrones es el oxígeno, en los sistemas anóxicos es un aceptor exógeno diferente, generalmente inorgánico como, por ejemplo, NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2 , SeO_4^{2-} , etc. (Prescott, 2002).

Los compuestos inorgánicos del nitrógeno son los aceptores de electrones más comunes en los procesos anóxicos (Madigan *et al.*, 2015); y específicamente, en la desulfuración anóxica, el aceptor de electrones por excelencia es el nitrato (Almenglo *et al.*, 2016; Soreanu *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2014). Las ecuaciones globales en este proceso, son las siguientes (Soreanu *et al.*, 2008a; Cardoso *et al.*, 2006):

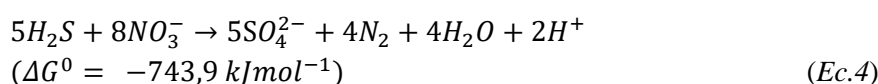
Para la desnitrificación completa unida a la oxidación parcial del H_2S (Ec.3) siendo el azufre elemental el producto final:



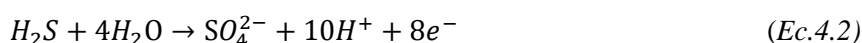
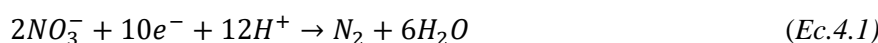
Cuyas ecuaciones parciales son:



En cambio, para la desnitrificación completa con la oxidación total del H_2S (Ec.4), obteniéndose sulfato como producto de la misma, se ha propuesto:



Con las ecuaciones parciales siguientes:



Las investigaciones que se han realizado empleando sistemas de biofiltración anóxica con nitrato han estudiado múltiples variables del proceso. Un ejemplo es el estudio de diferentes formas de nitrato ($Ca(NO_3)_2$, KNO_3 y $NaNO_3$) como aceptores de electrones, llevado a cabo por Fernández *et al.* (2014). Estos autores concluyen que la fuente de nitrato que se empleó no tiene efecto sobre la eficiencia de eliminación del sistema, aunque observaron un aumento de precipitados usando $Ca(NO_3)_2$ debido a la baja solubilidad de las sales de calcio.

Los datos mostrados en la Tabla 3 indican los altos valores del porcentaje de eliminación que han sido alcanzados en distintos sistemas anóxicos, así como el uso de diferentes materiales de soporte, tales como: espuma de poliuretano, fibras de plástico, piedra volcánica o anillos de polipropileno (Fernández *et al.*, 2014; Soreanu *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2013).

La importancia del material de soporte en los aspectos relacionados con la inmovilización de la biomasa es un hecho, y dan fe de ello los resultados experimentales descritos en la bibliografía. Por ejemplo, la máxima concentración de biomasa inmovilizada alcanzada por Soreanu *et al.*, (2008b) ($2,4 \times 10^5$ células (mL soporte)⁻¹), empleando fibras plásticas como soporte, o los valores máximos alcanzados por (Ziemiński y Kopycki, 2016) en tres BTFs similares que emplearon como material de relleno, polietileno de alta densidad ($6,3 \times 10^8$ colonias (g soporte seco)⁻¹), anillos Raschid cerámicos ($2,7 \times 10^8$ colonias (g soporte seco)⁻¹ y arcilla expandida ($5,0 \times 10^8$ colonias (g soporte seco)⁻¹.

En procesos donde se produce la desnitrificación, el pH es un parámetro muy importante a tener en cuenta. Muchos de los estudios anteriormente analizados se llevaron a cabo en un rango estrecho de valores de pH (6,3-7,5). No obstante, se debe tener en cuenta, que la reducción disimilatoria de nitrato a N₂ produce una base muy fuerte, específicamente en el paso de nitrito a óxido nítrico (Lee y Rittmann, 2003), pero otro producto intermedio en este proceso es el óxido nitroso (N₂O), que se acumula a pH ácido y resulta ser un compuesto muy tóxico para las bacterias desnitrificantes (Thomsen *et al.*, 1994). Dicha acumulación se produce debido a la inhibición progresiva de la actividad de la enzima óxido-nitroso reductasa.

Como se ha mencionado anteriormente, el nitrato no es la única posibilidad en los procesos anóxicos; también el nitrito, como forma oxidada del nitrógeno, puede ser un aceptor de electrones eficaz en la oxidación de compuestos reducidos de azufre (Greene *et al.*, 2003).

Tabla 3 Parámetros de operación y diseño para la eliminación de H₂S en sistemas anóxicos. Comparación entre estudios realizados en BTFs operados con nitrato.

Material de relleno	EBRT (min)	Volumen de lecho (L)	pH	EC _{max} (g Sm ⁻³ h ⁻¹)	TLV (m h ⁻¹)	Referencia
OPUF	29,7-78,9	2,0	7,0	4,3-26,0 (RE 99,02%)	2,0	(Lebrero <i>et al.</i> , 2015)
Fibras de poliéster	7,8	6,7	6,5	11,0 (RE 74%)	1,7	(Soreanu <i>et al.</i> , 2009)
Piedra volcánica	7,8	6,7	6,5	9,96 (RE 67%)	1,7	(Soreanu <i>et al.</i> , 2009)
OPUF	1,5	2,4	7,4-7,5	99,9 (RE 95%)	7,0	(Montebello <i>et al.</i> , 2012)
Anillos de polipropileno	2,4	2,4	7,4-7,5	145,3 (RE 96,6%)	7,0	(Fernández <i>et al.</i> , 2013)
Fibras de plástico	17,0	12,0	6,3	15,3 (RE 66%)	1,7	(Soreanu <i>et al.</i> , 2008b)
OPUF	4,6	167,0	7,2	94,7 (RE >99%)	7,6	(Almenglo <i>et al.</i> , 2016)

2.2.2.2 Procesos anóxicos con nitrito.

La posibilidad de emplear nitrito como aceptor de electrones en procesos anóxicos se encuentra justificada por el potencial estándar de reducción (+0,44 V), que es similar al del nitrato (+0,42 V). Aunque ambos compuestos pueden sustituir al oxígeno (+0,82 V) y actuar como aceptores de electrones en los procesos anóxicos (Prescott, 2002), es importante destacar que a favor del uso del nitrato en la oxidación del H_2S existe un consumo de electrones mayor (Ec. 3.1) respecto a la utilización de nitrito (Ec. 5.1). En cambio, el uso del nitrito puede verse favorecido por la alta reactividad de estos iones en estado acuoso (Mahmood *et al.*, 2008).

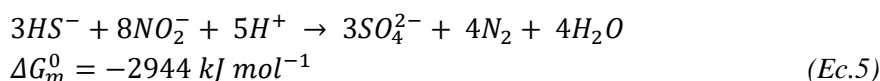
En este sentido, los primeros estudios para la oxidación biológica de sulfuro que emplearon nitrito como aceptor de electrones (Mahmood *et al.*, 2007), demostraron su efectividad como tal en el tratamiento de un efluente sintético con alta carga de sulfuro ($1920 \text{ mgS}^{2-} \text{ L}^{-1}$, RE 89-90%).

De igual forma, resultan muy interesantes los resultados de la investigación desarrollada por Moraes *et al.* (2012), que fue llevada a cabo en dos reactores de lecho fijo con nitrito y nitrato para realizar simultáneamente la oxidación de sulfuro y la desnitrificación autotrófica. Tras analizar los datos de consumo de ambos reactores, los autores destacan como el consumo de nitrito fue apreciable desde el primer día de operación, a diferencia del reactor que operaba con nitrato, cuyo consumo fue apreciable a partir del décimo día de operación. Por lo que concluyeron, que los microorganismos necesitaron mucho más tiempo para el uso eficiente del nitrato respecto al nitrito.

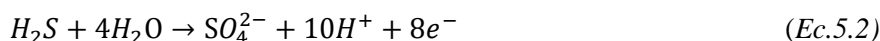
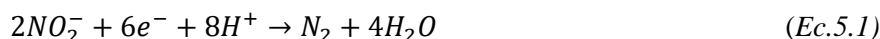
A modo de comparación, el estudio llevado a cabo por Mahmood *et al.* (2007) se realizó en dos reactores de oxidación anóxica de sulfuro que utilizaron nitrito y nitrato como aceptores de electrones. Esta investigación destacó la mayor tolerancia del reactor que operó con nitrito, en términos de carga del efluente a tratar ($2265 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$; $1920 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$), respecto al que trabajó con nitrato ($140 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$; $580 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$) y justificaron este hecho por la mayor reactividad de estos iones.

Las ecuaciones globales que describen la oxidación de sulfuro con nitrito, han sido descritas por Mahmood *et al.* (2007):

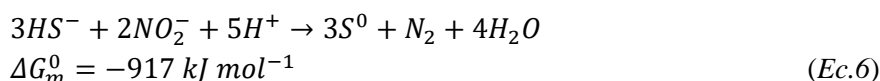
Para la desnitrificación completa y la oxidación total del H₂S (Ec.5):



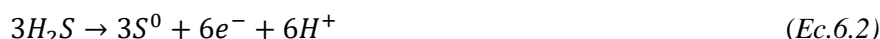
Siendo las ecuaciones parciales:



Sin embargo, para la desnitrificación completa y la oxidación parcial de H₂S, ha sido propuesta la siguiente ecuación:



Y las correspondientes ecuaciones parciales son:



Tras analizar las ecuaciones anteriores, desde el punto de vista termodinámico, se concluye que la producción de sulfato está más favorecida. No obstante, en la operación de los sistemas biológicos es muy común la acumulación de azufre elemental en lugar de llevarse a cabo una oxidación total hasta sulfato. La producción de azufre es normalmente mayoritaria dado que la disponibilidad del mismo suele ser limitada (García de Lomas *et al.*, 2006) y, por tanto, como se necesita una mayor cantidad para producir sulfato (Ec. 5), resulta en que el azufre sea el compuesto mayoritario. Solo en casos de exceso de nitrato puede obtenerse una mayor producción de sulfato (Almenglo *et al.*, 2016). Es importante también tener en cuenta que el azufre elemental es insoluble, y para su oxidación es necesario la adhesión de las bacterias a sus cristales (Madigan *et al.*, 2015). Lo anterior provoca que las bacterias sulfuro-oxidantes lleven a cabo en primer lugar la oxidación del sulfuro y solo en caso de una baja concentración del mismo pasan a oxidar el azufre elemental, lo cual

también favorece la acumulación del azufre elemental (Cho *et al.*, 1991; Jin *et al.*, 2005). De ahí, que solo el punto de vista termodinámico es insuficiente para conocer qué producto final de oxidación está más favorecido. Además, los procesos biológicos dependen también de aspectos cinéticos y físico-químicos como el pH, fuerza iónica, la temperatura, etc. (Millero *et al.*, 1987).

También debe ser considerada la contribución biótica a las reacciones de oxidación de H_2S (Jørgensen *et al.*, 1991), donde de igual manera que dependen del oxidante químico, también influyen la población y actividad de las comunidades microbianas presentes (Luther *et al.*, 2011). En este sentido, algunos estudios sugieren que en condiciones limitantes de la fuente de energía (H_2S), los microorganismos sulfuro-oxidantes pueden digerir el azufre elemental disponible, pudiéndose producir más biomasa en el sistema (Duan *et al.*, 2005).

De ese mismo análisis de las ecuaciones de oxidación del sulfuro se obtiene que la ratio molar ($\text{N}:\text{S}_{\text{in}}$), considerando desnitrificación completa y empleando nitrito como aceptor de electrones es 0,67 en la oxidación parcial (Ec.5), mientras que en la oxidación total a sulfato se requieren 2,67 mol de N-NO_2^- por cada mol de sulfuro (Ec.6). Por lo que es un hecho, que llevar a cabo la oxidación de sulfuro empleando nitrito en vez de nitrato (Ec.3-4), requerirá una mayor cantidad (66,8-67,5%), de compuesto de nitrogenado.

La auto-inhibición del sistema (Gharasoo *et al.*, 2015) es un fenómeno que se debe de tener en cuenta en la operación con nitrito. De ahí, que se hayan llevado a cabo estudios para dilucidar mecanismos inhibitorios, como la investigación desarrollada por Detlef y Conrad, (1998), sobre los posibles efectos tóxicos de diferentes compuestos nitrogenados en la metanogénesis. Estos autores evalúan y corroboran el efecto inhibitorio de algunos compuestos estudiados, entre lo que se encontraba el nitrito, sobre las bacterias metanogénicas *Methanosarcina barkeri* y *Methanobacterium bryantii*.

Otro ejemplo ha sido el estudio desarrollado por Huang *et al.* (2007), en la eliminación de fósforo mediante desnitrificación anóxica, donde los resultados obtenidos indican la inhibición total del proceso para concentraciones de nitrito superiores a $30 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$, mientras que valores inferiores a este límite resultaron muy favorables para el proceso

en estudio. De manera similar, se ha descrito la inhibición del crecimiento quimiolitotrófico de bacterias sulfuro-oxidantes (Kodama y Watanabe, 2003), para concentraciones de nitrito superiores a $32,2 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$.

Para el nitrito que, por lo general, es más activo y tóxico que el nitrato, se ha demostrado su efecto negativo sobre los sistemas de lodo activado (Jing et al., 2010). La acción inhibitoria en estos sistemas, se debe fundamentalmente a la forma protonada del nitrito, el ácido nitroso libre (FNA) (Zhou et al., 2011).

La estrecha relación entre el carácter inhibitorio y el pH es un hecho, que ha sido demostrado en la investigación llevada a cabo por Glass *et al.*, (1997). Los resultados demostraron que un sistema de lodos activos fue capaz de tratar cargas de hasta $2 \text{ g N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ mientras el pH se mantuvo por encima de 8. No obstante, los primeros síntomas de inhibición de la actividad desnitrificante fueron observados a pH 7 y cargas inferiores a $0,25 \text{ g N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$. Mientras que la inhibición total del sistema se produjo cuando el pH alcanzó el valor de 6 y a valores de cargas inferiores a $0,03 \text{ g N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$. Dicho comportamiento, fue asociado a la posible acumulación de ácido nitroso.

La acción biocida de este compuesto (FNA) ha sido estudiada por Jiang *et al.*, (2011) en reactores de lecho fijo para el tratamiento de aguas residuales domésticas; encontrándose una disminución de aproximadamente el 80% de los microorganismos presentes en la biopelícula tras un período de operación de 6-24 h a concentraciones de FNA superiores a $0,2 \text{ mg-N L}^{-1}$.

En la eliminación de fósforo empleando bacterias desnitrificantes, Hu *et al.* (2003) plantean que el uso de nitrito es factible como aceptor de electrones, siempre que su concentración no exceda una concentración inhibitoria ($160 \text{ mgN-NO}_2^-(\text{gVSS L})^{-1}$), que dependerá del tipo de lodo (comunidad microbiana) y las condiciones de operación del sistema.

En sistemas de desulfuración anóxica se ha indicado previamente que no existe inhibición cuando la concentración de nitrito ha alcanzado valores entre $0,45\text{-}0,79 \text{ gN-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ (Fernández *et al.*, 2014), en la operación a pH 7,3-7,5.

El estado del arte en estos aspectos sugiere que, aunque existen algunos trabajos que destacan qué papel juegan los cambios de receptores de electrones, el uso de nitrito como aceptor de electrones no está bien

investigado y necesita ser profundizado (Munz *et al.*, 2015). Además, es de gran interés ya que la producción de nitrito a partir de un efluente rico en amonio, requiere un menor suministro de oxígeno y, por ende, un menor consumo energético (Mohseni, 2005).

2.2.3 Biofiltración anóxica vs. aerobia.

La principal ventaja del sistema aerobio radica en su bajo coste de operación, dado que se usa aire como fuente de oxígeno, donde los costes son exclusivamente debido al consumo eléctrico y la instalación del compresor-soplante.

Con respecto a la reducción de la concentración de metano, Montebello *et al.* (2012) trabajaron con una dilución del 6 al 32% del caudal total de gas. No obstante, la dilución puede ser reducida si se emplea un elemento externo que aumente de manera eficiente la transferencia del oxígeno sin que implique un mayor caudal de aire, de manera similar al utilizado por Rodríguez *et al.* (2014). Este estudio permitió aumentar la cantidad de oxígeno transferido respecto al oxígeno suministrado de 1,4% cuando se utilizó un sistema convencional de suministro de oxígeno (difusor), a un 26,7% cuando fue empleado un jet-venturi, reduciendo el caudal de aire más de cuatro veces. Incluso, el control anticipado sobre la TLV, también puede evitar que aumente la dilución del biogás (López, 2016).

La versatilidad de estos sistemas se manifiesta principalmente en el pH de trabajo, ya que es posible trabajar a pH neutro (Maestre *et al.*, 2010; Fortuny *et al.*, 2011; Lebrero *et al.*, 2012) o a valores de pH ácido (Rodríguez *et al.*, 2014; Charnnok *et al.*, 2013; Tomàs *et al.*, 2009).

No obstante, el principal inconveniente es desde el punto de vista de la seguridad ya que en caso de fallo del sistema de control de aireación se podría alcanzar una composición del biogás explosiva (5 a 15% v/v en el aire) (Rodríguez *et al.*, 2014).

Las ventajas más importantes de los sistemas anóxicos radican en la reducción del riesgo de explosión, la no dilución del biogás y la mejor

transferencia de masa para la disponibilidad del nitrato/nitrito, por su mayor solubilidad en comparación con el oxígeno, lo cual permite lograr una concentración del aceptor de electrones más alta que en los sistemas aeróbicos (Montebello *et al.*, 2012; Kleerebezem y Mendez, 2002).

Sin embargo, la principal limitación de los sistemas anóxicos está en la naturaleza del aceptor de electrones que es utilizado, ya que si se trata de un reactivo químico se incrementan los costes de operación asociados, y a la par, deben ser considerados los riesgos de almacenamiento debido a que las sales de nitrato son muy comburentes y el contacto con otros materiales provoca riesgos de incendio (Dechy *et al.*, 2004).

La alternativa al uso de nitrato químico radica en el uso de nitrato generado biológicamente, a partir de un proceso de nitrificación de aguas residuales con alto contenido de amonio. Este sistema conllevaría además la ventaja que representa el tratamiento de dos efluentes: biogás con H_2S y aguas residuales (Sun *et al.*, 2014; Carrera *et al.*, 2004; Pacek *et al.*, 2015). El uso de nitrato generado biológicamente mediante un reactor de nitrificación, tendría como consecuencia una notable reducción del impacto ambiental respecto a otras posibles alternativas de tratamiento (Cano *et al.*, 2016b).

Un problema común para ambos sistemas (aerobios y anóxicos) es la acumulación de azufre elemental en el material de empaque del lecho (Montebello *et al.*, 2012), debido a condiciones de operación limitantes en cuanto a la disponibilidad del aceptor de electrones. La magnitud de dicho inconveniente puede ser reducida si se lleva a cabo la oxidación total del sulfuro en el sistema mediante el aumento de la concentración del aceptor de electrones y la consecuentemente formación de sulfato (López *et al.*, 2016; Almenglo *et al.*, 2016).

La tabla 4, muestra las principales ventajas y desventajas de ambos sistemas.

Tabla 4 Ventajas y desventajas de los biofiltros percoladores anóxicos y aerobios.

BTF	Ventajas	Desventajas
Aerobio	<ul style="list-style-type: none"> - Bajo coste de operación si se usa aire como fuente de O₂. - Puede trabajar a pH ácido o neutro. 	<ul style="list-style-type: none"> - Reducción de la concentración de CH₄ (dilución con el N₂ del aire). - Baja solubilidad del O₂. - pH neutro: Alto consumo de agua. - pH ácido: Descarga de agua ácida. - Riesgo de explosión. - Límites superior e inferior de inflamabilidad del metano del 5 y 15% v/v, respectivamente.
	<ul style="list-style-type: none"> - No se reduce la concentración de metano. - Alta solubilidad del nitrato. 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto coste de operación con nitrato químico.
Anóxico	<ul style="list-style-type: none"> - Mejor control de la ratio N:S_{in} y por tanto de la selectividad a sulfato:azufre. - Posibilidad de tratar de forma simultánea dos efluentes: biogás y efluente rico en amonio. 	

A pesar de las notables diferencias entre ambas tecnologías, hoy en día, los métodos biológicos son capaces de reducir el contenido de H_2S a un nivel por debajo de 100 ppm_v (Holm-Nielsen *et al.*, 2009).

Dependiendo de otras condiciones operacionales como pueden ser el tiempo de residencia de lecho vacío (EBRT), TLV, volumen y material de lecho o modo de operación y dosificación del aceptor de electrones, existen estudios donde se han alcanzado concentraciones de H_2S de salida inferiores a 30 ppm_v (Maestre *et al.*, 2010; Fortuny *et al.*, 2011), en sistemas aerobios que han operado con concentraciones de entrada de hasta 2000 ppm_v. En este mismo sentido, los trabajos llevados a cabo en sistemas anóxicos, (Almenglo *et al.*, 2016; Soreanu *et al.*, 2008b), han alcanzado concentraciones de H_2S de salida entre 10-98 ppm_v, en el tratamiento de biogás con una concentración de H_2S de entrada de 1000-4800 ppm_v.

2.3 Microbiología de las poblaciones.

El éxito de los métodos biológicos radica en disponer de una biomasa totalmente adaptada y que haya desarrollado una alta capacidad de degradación, además de un excelente contacto entre las fases gas-líquido del sistema, que favorezca los fenómenos de transferencia de masa que en el mismo tienen lugar.

En el caso de la oxidación del H_2S , ésta es llevada a cabo principalmente por microorganismos quimioautótrofos (Syed *et al.*, 2006). Se debe tener en cuenta, que sobre las poblaciones microbianas que intervienen en estos procesos influyen determinados aspectos de carácter macroscópico (Fig. 1), que, a su vez, provocan respuestas de las comunidades desde nivel fisiológico hasta el nivel estructural, e influyen en la función macroscópica del ecosistema bajo las condiciones que causaron la perturbación (Cabrol y Malhautier, 2011).

Las investigaciones llevadas a cabo sobre las comunidades microbiológicas presentes en procesos de desulfuración de biogás son escasas, a pesar del avance que se ha producido en las técnicas analíticas

de biología molecular como la electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE), la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), la pirosecuenciación, entre otras.

Los primeros trabajos sobre la ecología de las poblaciones en la desulfuración anóxica de biogás se remontan a Jing *et al.* (2010). Estos autores compararon las bandas obtenidas en el análisis DGGE, que provenían de dos reactores anaerobios de flujo ascendente (UASB) para la oxidación de sulfuro, uno operado con nitrato y otro con nitrito. Y llegaron a la conclusión de que las comunidades microbianas en los dos reactores eran similares, siendo predominantes las proteobacterias de las clases *Betaproteobacterium* y *Alphaproteobacteria*.

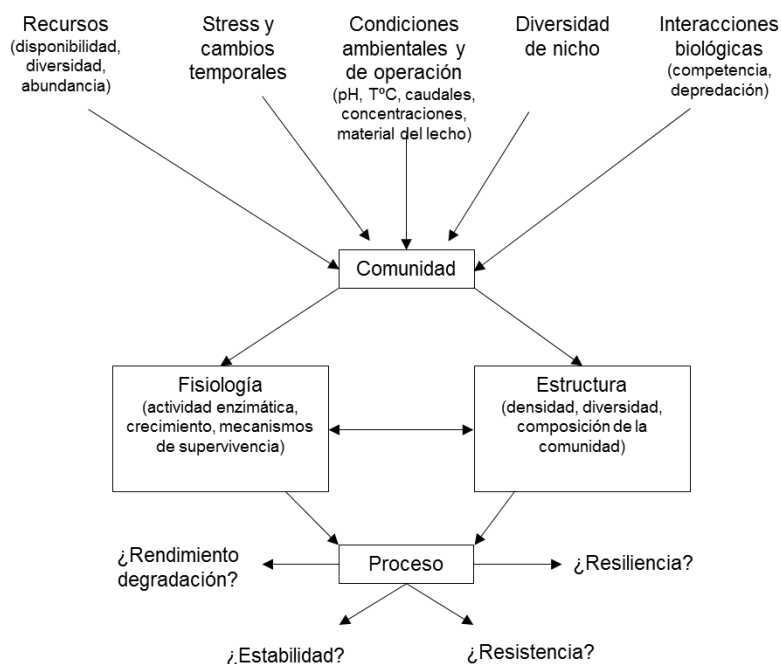


Figura 1. Vínculos entre los componentes macroscópicos y respuesta de las comunidades (Cabrol y Malhautier, 2011).

Una ventaja de la DGGE, sobre otras técnicas de huella o rastreo molecular, es que la intensidad de cada banda podría proporcionar una estimación de la abundancia de taxones específicos (Nikolcheva *et al.*,

2005; Nübel *et al.*, 1999). Dicha intensidad de banda podría estar directamente relacionada con la densidad del filotipo correspondiente en la muestra, si no se produjo ningún sesgo durante todo el procedimiento de extracción-amplificación de los genomas microbianos (Murray *et al.*, 1998).

La identificación de los microorganismos presentes en determinados procesos biológicos ha permitido conocer que algunos son capaces de emplear tanto el oxígeno como el nitrato como aceptores de electrones (Hvitved-Jacobsen *et al.*, 2013). Por ejemplo, el *Thiobacillus denitrificans* ha sido empleado de forma exitosa, tanto en la desulfuración aerobia como anóxica (Solcia *et al.*, 2014; Krishnakumar y Manilal, 1999; Kleerebezem y Mendez, 2002).

De manera similar, el estudio de eliminación biológica de fósforo desarrollado por Ahn *et al.* (2002), identificó la proteobacteria *Rhodocyclus* sp. con un 96% de coincidencia, tras comparar las poblaciones de tres reactores operados de forma anóxica, aerobia y anóxica-aerobia. Hecho sustentado también por los resultados obtenidos por Cytryn *et al.* (2005). Donde se indicó la presencia de las clases *Alphaproteobacteria* y *Bacteroidetes*, tras analizar muestras procedentes de las zonas aerobia y anóxica, de la biopelícula de un reactor de lecho fluidizado, utilizado en el estudio de la actividad sulfuro-oxidante.

En el análisis de DGGE, realizado por Fernández *et al.* (2013), en el estudio de la oxidación de H₂S en un BTF anóxico, se incluyeron muestras biológicas procedentes del líquido de recirculación y de los lechos superior e inferior de un biofiltro percolador relleno de anillos Pall. Los resultados indicaron que se habían establecido las mismas poblaciones a lo largo del lecho cuando se compararon las muestras del lecho superior e inferior. También; estos autores descartaron la presencia de *Sulfurimonas denitrificans* ATCC 33889 y *Thiobacillus denitrificans* DSM 12475, en la población analizada tras comparar con cultivos puros, sugiriendo que otras bacterias sulfuro-oxidantes nitrato-reductoras son las encargadas de la correcta operación del biorreactor.

Por otro lado, la estabilidad de las poblaciones fue estudiada por Mora *et al.* (2014), quienes realizaron un análisis mediante DGGE de un cultivo procedente de un biofiltro percolador anóxico a escala piloto (Almenglo *et al.*, 2013) y concluyeron que la mayoría de las especies

detectadas en el inóculo fueron preservadas a lo largo de la operación del BTF, habiendo sido descartada la presencia de *Thiobacillus denitrificans* DSM 12475, tras la comparación con un cultivo puro de esta especie.

Recientemente, Almenglo *et al.* (2016) emplearon el análisis microbiano basado en pirosecuenciación para comunidades presentes en un BTF anóxico a escala piloto. Estos autores encontraron que las *proteobacterias* fueron predominantes (64-97%) en todas las muestras analizadas, y concluyeron que las principales bacterias que participan en el proceso de desulfuración en el BTF son las que pertenecen a la familia *Incertae Sedis*, con la identidad asignada *Sedimenticola*. Específicamente estas bacterias despiertan interés por su versatilidad metabólica y su potencial para la desnitrificación autótrofa, formando S⁰ extracelular (Flood *et al.*, 2015).

2.4 Sistemas de control.

Como anteriormente ha sido comentado, el coste y la disponibilidad de grandes cantidades de nitrato de naturaleza química reduce la aplicación de los sistemas anóxicos. Por tanto, se impone la optimización de la dosis de nitrato para reducir el gasto del mismo y la disminución de la concentración en la salida del sistema a través del líquido purgado. Estos objetivos pueden ser logrados implementando un sistema de control adecuado.

El objetivo de un sistema de control automático en un proceso es ajustar la variable manipulada (MV) para mantener la variable controlada (PV) en su punto de ajuste, a pesar de las perturbaciones que se produzcan en el proceso. Por otro lado, el control proporciona un ambiente seguro, al mismo tiempo que mantiene los niveles de rendimiento de la planta, y reduce la demanda de mano de obra humana (Smith y Corripio, 1985).

El campo de aplicación de estos sistemas se ha visto considerablemente ampliado, y a ello ha ayudado el desarrollo de los dos

mecanismos o estrategias de control principales: Control retroalimentado (*feedback*) y control anticipado (*feedforward*).

2.4.1 Control retroalimentado.

Este sistema tiene dos componentes fundamentales, la variable manipulada, también llamada variable de control, que influye sobre el proceso a través de un actuador, y la variable controlada, la cual es medida por un sensor (Fig. 2). El valor deseado de la PV, se denomina *set point*, punto de consigna o valor de referencia.

En términos de control, el error es la diferencia entre el *set point* y la medición de la salida del proceso. Así el controlador en base a la medida del error realiza una acción de control sobre la variable de control para mantenerla lo más cercano posible al *set point*.

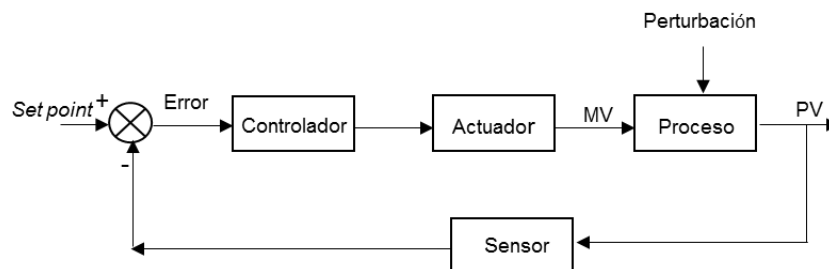


Figura 2. Esquema general del control retroalimentado.

Esta estrategia es una técnica muy simple que compensa las perturbaciones que afectan a la variable controlada, una vez que PV se desvía del punto de ajuste. La realimentación no reconoce que la perturbación entra en el proceso, solo trata de mantener la variable controlada en el punto de ajuste y, al hacerlo, compensa todas las perturbaciones (Datta *et al.*, 2013).

Esta estrategia de control funciona con conocimientos mínimos del proceso y su principal desventaja es que solo puede compensar una perturbación después que PV se ha desviado del *set point*. De esta forma,

los controles retroalimentados evitan la limitación más importante que se presenta en los controles anticipados (Apartado 2.4.2); la sensibilidad a las perturbaciones impredecibles (Kramer *et al.*, 2007; Cervin *et al.*, 2002). Por esta razón, son los sistemas de control retroalimentados los de mayor aplicación (Smith y Corripio, 1985).

No obstante, resulta inevitable en estos mecanismos de control que la medición del ruido sea igualmente retroalimentada al sistema. Esto ocasiona acciones de control no deseadas que provocan variaciones en la variable de control y saturación en las acciones del actuador.

Es imperativo mantener estas variaciones en niveles razonables. Incluso a veces es necesario acudir a criterios más profundos del diseño del controlador, como por ejemplo la medición y filtrado del ruido empleando una función de transferencia específica, que es incorporada a la función de transferencia del controlador (Åström *et al.*, 2006).

Respecto al sensor como componente del lazo de control, podemos afirmar que es un elemento de gran importancia debido a que proporciona en todo momento la lectura o medición de la variable de proceso. Esto permite cuantificar el error y la posterior actuación sobre la variable manipulada. En los sistemas de desulfuración de biogás la variable que normalmente se desea controlar es la concentración de salida de H_2S , y para tener una medida en continuo de este parámetro, se suelen emplear sensores de tipo electroquímico (Kramer *et al.*, 2007).

Otros autores emplean la medida del potencial de oxidación-reducción (ORP) para determinar de forma indirecta la concentración de sulfuro en medio líquido (Khanal y Huang, 2003; Almenglo *et al.*, 2016). También se puede considerar la alternativa planteada por Redondo *et al.* (2008), quienes han desarrollado un sistema de medida de sulfuro en medio líquido mediante análisis por inyección de flujo (FIA), con un electrodo de ion selectivo que podría ser implementado en un sistema de control. Este sistema permite la medición de concentraciones de sulfuro tanto en fase líquida ($0,61\text{-}3,20 \text{ mgS}^{2-} \text{ L}^{-1}$), como en fase gaseosa ($400\text{-}10000 \text{ ppm}_v$) (Montebello *et al.*, 2010).

La medición en continuo de la concentración del aceptor de electrones en los sistemas aerobios se realiza con sensores de oxígeno disuelto, con muy poco grado de complejidad (Montebello *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2012; López *et al.*, 2016). Sin embargo, la medición en

sistemas anóxicos resulta muy compleja, y aunque en el mercado es posible encontrar electrodos de ion selectivo para la medición de nitratos, éstos presentan inhibición por sulfuro estando por tanto descartada su aplicación (Fernández *et al.*, 2014).

2.4.1.1 Control *On-Off*.

Dentro del control retroalimentado, es el control tipo *On-Off* la variante más simple. Su notable simplicidad radica en que no es necesario el ajuste de ningún parámetro, por lo que es un modo de control muy utilizado cuando no se requiere un ajuste muy preciso en la variable de control (Ingham *et al.*, 2008).

Este sistema resulta muy competitivo comparado con otros, debido a su baja relación coste-efecto, y generalmente cuando es empleado, tiene éxito en mantener la variable de proceso cerca de del *set point*. No obstante, la principal desventaja de este controlador es la oscilación persistente de la variable de proceso en torno al *set point* (Visioli, 2006).

Entre las aplicaciones en sistemas biológicos encontramos el control de nivel de líquido de recirculación de un biolavador a escala piloto, para la desulfuración de biogás (Turker *et al.*, 2012), o el control de pH en BTFs aerobios empleados en el tratamiento de una mezcla de H_2S , NH_3 y $\text{C}_2\text{H}_6\text{S}$ (etilmercaptano) (Hernández *et al.*, 2013). También se ha empleado en modificaciones realizadas en un BTF aerobio, como sistema de control para mantener la concentración de oxígeno en el biogás de salida entorno al 2% v/v (Rodríguez *et al.*, 2014). Incrementando el oxígeno disuelto del sistema de $1,4 \pm 1,1$ a $2,8 \pm 1,4$ mg L^{-1} . Lo que permitió alcanzar una capacidad de eliminación (EC) de 54 ± 13 gS $\text{m}^{-3} \text{h}^{-1}$ (RE del $99 \pm 2\%$), con un $61 \pm 12\%$ de conversión a sulfato. Por lo que, la implementación de este modo de control, aseguró que, en la oxidación aerobia de sulfuro, se dispusiera de la cantidad necesaria de oxígeno evitando una excesiva dilución del biogás.

2.4.1.2 Control Proporcional (P).

Las oscilaciones que se producen en el control *On-Off* son debidas a la reacción exagerada del sistema, ya que un pequeño cambio en el error hará que la variable manipulada cambie en el rango completo. Este efecto se evita con un control de tipo proporcional, haciendo que la señal de control sea proporcional al error. La función de transferencia para este controlador sería:

$$y(t) = k_p * \epsilon(t) \quad (Ec.7)$$

Donde k_p es la ganancia del controlador proporcional, y el término $\epsilon(t)$ es el error calculado entre PV y el *set point*.

Una desventaja inherente a este modo de control es que se produce un error en el estado estacionario (*offset*) después de un cambio de *set point* o una perturbación sostenida. Por tanto, su aplicación se limita a sistemas de control donde las compensaciones puedan ser toleradas y su principal atractivo radica en su simplicidad (Seborg *et al.*, 2010).

Algunas aplicaciones en sistemas biológicos han sido en el control de la dosificación de oxígeno mediante el valor del ORP, en un biorreactor para la oxidación de sulfuro (Janssen *et al.*, 1998), o controlando el caudal del medio mineral para mantener, en un fermentador, una determinada densidad óptica y por ende una determinada concentración de biomasa (DiBiasio *et al.*, 1981).

Pero sin dudas, su mayor utilidad se encuentra en el diseño de estrategias de control en sí, ya que la ganancia de este controlador es empleada en la estimación de las constantes de los controladores más complejos, empleando métodos de ajustes (*tuning*), que será abordado en el apartado 3.3.

2.4.1.3 Control Proporcional Integral (PI).

El principal inconveniente del control proporcional es que la variable de salida del proceso se desvía a menudo del punto de ajuste. Esta

limitación puede evitarse, si se incluye un término que haga que la acción de control sea proporcional a la integral del error.

La función de transferencia que describe este controlador es la siguiente:

$$y(t) = k_p \left[\epsilon(t) + \frac{1}{T_i} \int_0^t \epsilon(\tau) d\tau \right] \quad (Ec.8)$$

Donde se incorpora el término: $\frac{k_p}{T_i}$ que es la ganancia integral (k_i), parámetro ajustable dependiente del tiempo de acción integral.

Este método de control es ampliamente utilizado por la ventaja que supone la eliminación del *offset*; sin embargo, su principal desventaja es la tendencia a producir respuestas oscilatorias de la variable controlada y por ende influye en la estabilidad del sistema de control (Lipták, 2006).

Estos efectos indeseables pueden ser evitados mediante la sintonización adecuada del controlador (Apartado 3.3), o mediante la inclusión de una acción de control derivativa, que se aborda en el siguiente apartado, contrarrestándose de esta forma, los efectos desestabilizadores (Seborg *et al.*, 2010).

Entre las aplicaciones a sistemas biológicos de este modo de control encontramos la dosificación del oxígeno necesario para la oxidación de sulfuro (Janssen *et al.*, 1998), o el control de la temperatura, pH y la concentración de oxígeno para llevar a cabo también la oxidación biológica de sulfuro (Cees, 1990).

2.4.1.4 Control Proporcional Integral Derivativo (PID).

Una acción de control más compleja se produce cuando se le incorpora al controlador PI la habilidad anticipativa, mediante el uso de una predicción de la salida basada en la extrapolación lineal (acción derivativa). De esta forma cuando se implementa un control de tipo PID, se aplica correctamente la suma de tres tipos de acciones de control y la contribución de las entradas al controlador en el tiempo: proporcional, integral y derivativa. Este controlador puede ser descrito por la siguiente función de transferencia:

$$y(t) = k_p \left[\epsilon(t) + \frac{1}{T_i} \int_0^t \epsilon(\tau) d\tau + T_d \frac{d\epsilon(t)}{dt} \right] \quad (Ec.9)$$

A esta, se le incorpora el producto, $k_p T_d$, denominado ganancia derivativa (k_d), y que es un parámetro ajustable dependiente del tiempo de acción derivativo.

La acción predictiva, determinada por el término derivativo, es una predicción lineal del error que anticipa hacia donde el proceso se dirige al ver la velocidad de variación de la variable controlada. En teoría esta acción siempre debe mejorar la respuesta dinámica. Sin embargo, el problema de ruido en las señales, que se traduce en el movimiento excesivo de la MV, hace que a veces se desee evitar la acción derivativa (Willis, 1999).

Entre las aplicaciones del control PID a sistemas biológicos podemos mencionar, el control de parámetros físicos tales como la temperatura, pH, velocidad de agitación y las tasas de flujo (Aguilar *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1991). También ha sido empleado en el control del crecimiento celular (Rajinikanth y Latha, 2010; von Meien *et al.*, 2004), o la concentración de oxígeno disuelto (Åkesson y Hagander, 1999; Chotteau y Hjalmarsson, 2012; de Arespacochaga *et al.*, 2014b).

Es posible también encontrar ejemplos aplicados a la desulfuración del biogás. Tal es el caso del trabajo realizado por Ramos y Fdz-Polanco (2014), donde estos autores describen el uso de un controlador PID para el control del caudal de oxígeno usando la concentración de H_2S de salida como variable de control en un digestor anaerobio empleado para la producción de biogás a partir de aguas residuales. En este sentido, Arespacochaga *et al.* (2014b) controlan el caudal de aire en un BTF aerobio, logrando la valorización energética del biogás, que posteriormente fue empleado en una pila de combustible de óxido sólido (SOFC). Otra aplicación ha sido descrita por Baspinar *et al.* (2011), donde los controladores PID regulan el caudal de biogás y de agua residual en un proceso integrado aerobio-anóxico, que permite la eliminación de nitrógeno de la corriente líquida y la oxidación del sulfuro presente en el biogás.

A pesar de que los controladores PID son ampliamente usados en la industria, con un uso superior al 95% (Åstrom y Hägglund, 1995), es importante destacar que existen pocas referencias de su uso en sistemas anóxicos (Turker *et al.*, 2012), y más escasos aún son los estudios realizados en biofiltros percoladores (Yu *et al.*, 2008).

2.4.2 Control anticipado.

El control retroalimentado es la estrategia más comúnmente empleada en procesos industriales, debido principalmente a su simplicidad. No obstante, en algunos procesos, esta estrategia no puede proporcionar el control requerido, debido a retrasos de tiempos o por la aparición de variables no previstas en el sistema (Svrcek *et al.*, 2014), por lo que otras estrategias han tenido que ser desarrolladas.

En este sentido el control anticipado mide las perturbaciones y realiza la compensación antes de que la variable controlada se desvíe del *set point*, siendo por tanto mínima la desviación (Seborg *et al.*, 2010). Esta simple técnica complementa a la estrategia por retroalimentación y puede ser usada tanto para mejorar la respuesta al valor del *set point*, como para reducir el efecto de las perturbaciones medibles.

Un proceso sometido a esta estrategia de control, considerando un sistema lineal con dos entradas y una salida, puede ser descrito por:

$$y(s) = G_u(s)PV(s) + G_v(s)v(s) \quad (Ec.10)$$

Siendo PV la variable de control del proceso, v es la perturbación, " y " es la salida del sistema de control, G_v es la función de transferencia desde la perturbación a la salida y G_u es la función de transferencia desde la perturbación en la variable de control hasta la salida. (Fig. 3). Donde G_{ff} es la función de transferencia del control anticipado.

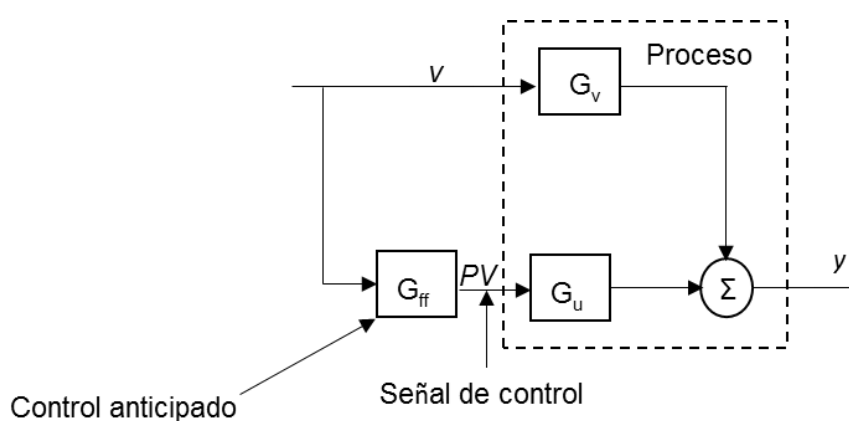


Figura 3. Diagrama de bloque del control anticipado (Levine, 1996).

Algunas aplicaciones de esta estrategia de control en sistemas biológicos están relacionadas con sistemas de lodos activos. Tal es el caso del control anticipado de la concentración de amoníaco para la óptima aireación de un sistema de lodos activos (Rieger *et al.*, 2014). Otro ejemplo es su utilización para evitar la acumulación de $\text{NO}_x\text{-N}$, productos de la desnitrificación incompleta, mejorando la eliminación de nitrógeno en un sistema que opera a nivel de planta piloto (Zhao *et al.*, 1994). O el trabajo realizado por Gray *et al.* (2012), donde el control anticipado optimizó la concentración de oxígeno disuelto, basado en la carga de entrada de una estación depuradora de aguas residuales. Lo cual fue implementado con el objetivo de garantizar los requerimientos necesarios de aireación y por ende disminuir la demanda energética del sistema.

Entre las desventajas más notables del sistema anticipado podemos citar (Seborg *et al.*, 2010):

- La variable de perturbación se debe medir o estimar.
- El sistema realiza medidas correctivas para las perturbaciones que no son medidas.
- Es necesario un modelo del proceso.

En ambientes industriales generalmente es poco rentable medir todas las perturbaciones que intervienen en el proceso y que influyen directamente en el control del mismo. Es por ello que, desde el punto de vista práctico, una estrategia que combine las dos anteriormente abordadas,

correctamente diseñada e implementada, puede proporcionar notables beneficios.

2.4.3 Anticipado-retroalimentado.

La combinación de estas dos potentes herramientas de control permite que el componente retroalimentado proporcione una acción correctiva para las perturbaciones que no son medidas. Mientras la otra parte, el control anticipado, reacciona para eliminar perturbaciones medidas antes de que la variable controlada se desplace notablemente del valor de ajuste (Cervin *et al.*, 2002). El diagrama de bloques que describe la integración de las dos estrategias se presenta en la figura 4.

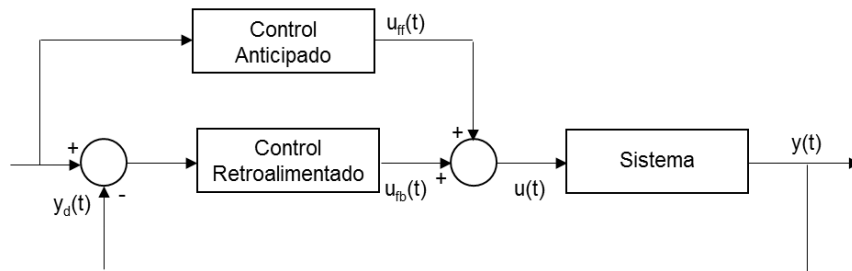


Figura 4. Diagrama de bloques del control anticipado - retroalimentado.

Las aplicaciones de esta estrategia en bioprocesos son muy interesantes, como el control en la dosificación de glucosa en una fermentación con alimentación discontinua. Esta acción permitió controlar el suministro de nutrientes para evitar la inhibición por exceso de sustrato (Lee *et al.*, 1999). Otro ejemplo ha sido descrito por Yong *et al.* (2005), donde se controla el nivel de oxígeno disuelto en un sistema previo a la desnitrificación, suministrando justo la cantidad de aire necesario para llevar a cabo el proceso e influir positiva y notablemente en los aspectos económicos del mismo; o el control de temperatura implementado por Nagel *et al.* (2001) en un fermentador de estado sólido.

2.5 Métodos de ajuste de controladores.

El paso más crítico en la aplicación de un controlador es el ajuste de los parámetros (Rajinikanth y Latha, 2010). Mediante los métodos de ajuste del controlador se calculan los parámetros de control empleando ecuaciones matemáticas o algoritmos. Estos permiten que el sistema de control sea estable y alcance los objetivos de control para el cual fue implementado. Los métodos son necesarios siempre que se implemente un sistema de control o siempre que sea observado un deterioro en el control de un sistema previamente implementado.

Los primeros estudios sobre el ajuste de controladores automáticos fueron realizados por Ziegler y Nichols (1942). Estas reglas se basan en dos ideas fundamentalmente. La primera, caracterizar un proceso dinámico empleando solo dos parámetros que se pueden determinar de manera experimental. En la segunda, se calculan los parámetros anteriores mediante una simple ecuación matemática (Hägglund *et al.*, 2008). Dichas reglas son las más conocidas y han tenido una gran influencia en la implementación de los controladores de tipo PID desde hace más de medio siglo (Åström, 2002).

No obstante, a partir de modificaciones de estas reglas se han desarrollado otros métodos de ajuste de controladores. Los cuales tratan de mejorar los aspectos más débiles de las reglas de Ziegler-Nichols, que son, el hecho de caracterizar un proceso dinámico a partir de tan poca información, posiblemente con poca robustez y el amortiguamiento de la variable controlada. Han sido desarrollados muchos métodos de ajuste, los de reciente creación se basan en términos del rechazo de las perturbaciones de carga y del ruido de la medición, sensibilidad a los errores de modelado, y la respuesta de consigna (Åström *et al.*, 1995).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Biofiltro percolador anóxico.

El diseño del BTF anóxico fue realizado con el objetivo de tener una instalación versátil. Esto permite que pueda ser adaptada en cualquier momento, sin mucha complejidad, a los cambios en el funcionamiento y operación del equipo. Cambios como: operación en flujo paralelo o contracorriente entre las fases gas y líquida, o cambios en el modo de alimentación del aceptor de electrones: operación en continuo (Fig. 5a) o en discontinuo (Fig.5b).

La configuración del modo de operación continua (Fig.5a) fue empleada en todos los experimentos realizados para el ajuste del sistema de control (Apartado 3.3), así como para estudiar el comportamiento del sistema ante diferentes perturbaciones, tanto con nitrato como con nitrito (Apartado 3.5), y en el estudio del efecto de los cambios progresivos del aceptor de electrones (Apartado 3.4). Por otro lado, en la columna de recirculación fue instalado un sensor de nivel, que fue empleado para controlar el volumen de recirculación en experimentos llevados a cabo en régimen de operación discontinuo. En este modo de operación (Fig.5b) se desarrolló una secuencia de acciones. En primer lugar, se debía de alcanzar determinado valor de ORP (*set point*), y en ese instante, la bomba de carga de medio mineral actuó añadiendo $0,36 \text{ L h}^{-1}$. Esta configuración fue empleada en los experimentos de control por ORP tanto para nitrato como con nitrito (Apartado 3.5.3).

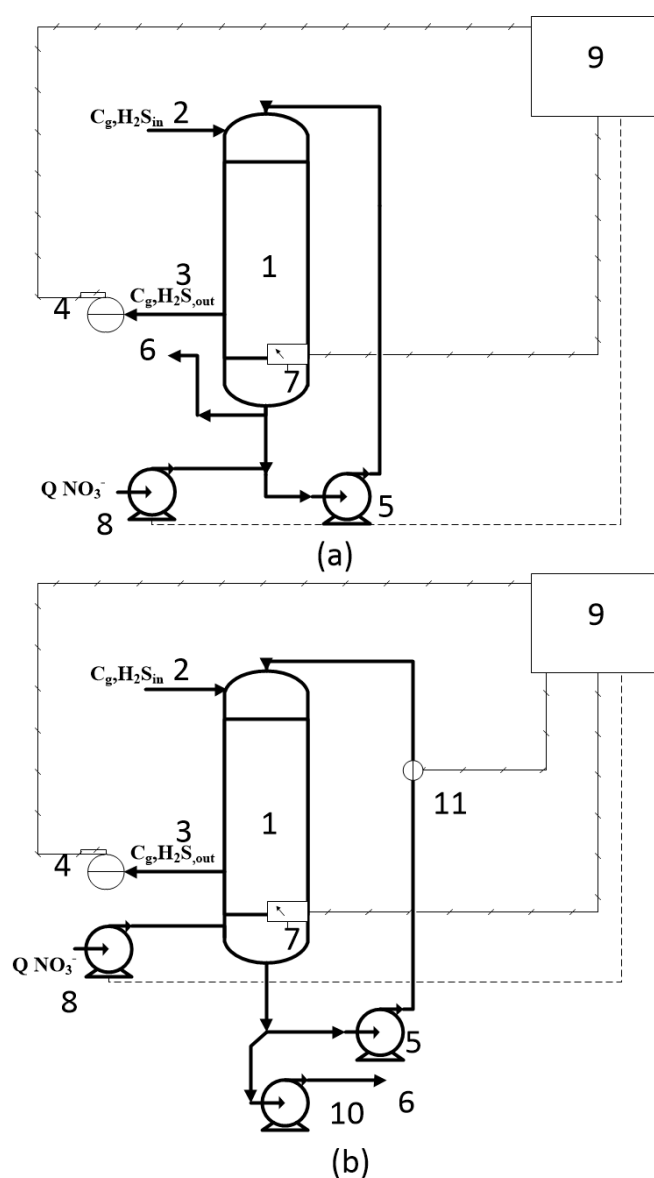


Figura 5. Modos de operación del BTF. (a) Operación en continuo; (b) operación en discontinuo. (1) BTF, (2) entrada de gas, (3) salida de gas, (4) sensor de H_2S , (5) bomba de recirculación, (6) purga de líquido, (7) sensor de nivel, (8) bomba de carga de medio mineral, (9) sistema de control acoplado a ordenador, (10) bomba de descarga y (11) sensor de ORP.

La estructura del cuerpo de los lechos fue construida con policloruro de vinilo (PVC) transparente (Agruquero Thermoplastics S.L, España), con un diámetro exterior de 75 mm y un espesor de 1,8 mm. El volumen total de lecho fue de 2,8 L, correspondiente a 600 anillos de polipropileno de 5/8 "(Pall Ring Company, Reino Unido), cuyas especificaciones se muestran en la tabla 5.

Tabla 5 Especificaciones técnicas del soporte empleado en el BTF.

Tamaño (mm)	Espacio libre (%)	Superficie específica (m²/m³)	Densidad (kg/m³)
16	88	320	110

Este material de empaque fue distribuido en cuatro módulos iguales. En el módulo superior fue instalado un difusor de líquido para la correcta distribución de este en el material de empaque y en paralelo con la corriente de gas.

La columna de recirculación (Fig. 6) fue construida con PVC transparente, (Agruquero Termoplásticos S.L., España) de diámetro exterior 110 mm y espesor 2,2 mm, y una altura de 640 mm. El volumen de recirculación fue de 3 L para los experimentos en discontinuo, y de hasta 3,5 L en los experimentos realizados en continuo, gracias a la instalación de un sifón en la base de dicha columna.

El líquido se recirculó mediante una bomba peristáltica (7554-95, ColeParmer, USA), con una velocidad superficial de líquido de recirculación (TLV) entre 10 y 15 m h⁻¹, que se corresponden con un caudal de líquido de recirculación de entre 20 y 60 L h⁻¹. Para el control de pH fue empleado un electrodo de gel presurizado (5331 Crison Instruments, España), acoplado a un multiparamétrico digital (Multimeter 44, Crison Instruments, España). Este mismo equipo fue empleado para el monitoreo del ORP, utilizando un electrodo de platino (5362 Crison Instruments, España). La temperatura se controló a 30 °C, empleando un termostato de refrigeración (Lauda Alpha, Alemania), junto a un refrigerante de bolas Allihn de 300 mm de longitud (Alamo, España) en la corriente de recirculación.

El pH en la corriente de recirculación se controló entre 7,4-7,5 (Apartado 3.2.1), añadiendo hidróxido de sodio (NaOH) (5 M) o ácido orto-fosfórico (H_3PO_4) (0,66 M), excepto en la etapa de inoculación y arranque del BTF, donde se mantuvo controlado entre 6,8-6,9.

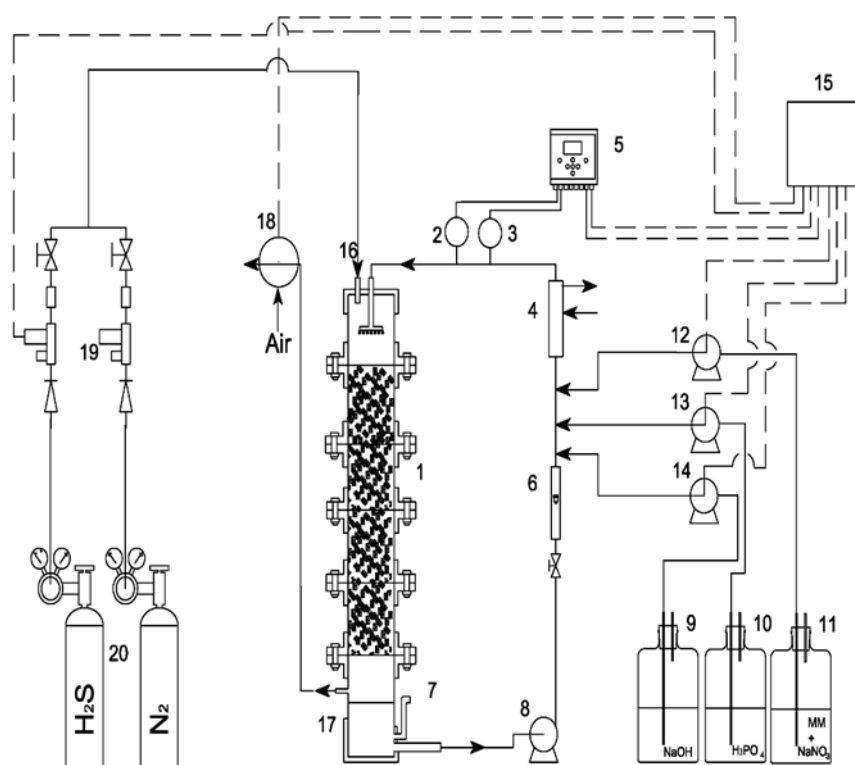


Figura 6. Esquema detallado del sistema de biofiltración. (1) BTF, (2) sensor ORP, (3) sensor pH, (4) intercambiador de calor, (5) multímetro 44, (6) rotámetro de líquido, (7) sifón para purga de líquido, (8) bomba de recirculación, (9) depósito de NaOH, (10) depósito de H_3PO_4 , (11) depósito de medio mineral y aceptor de electrones, (12) bomba peristáltica con salida analógica, (13) bomba para adición de H_3PO_4 , (14) bomba para adición de NaOH, (15) sistema de control acoplado a ordenador, (16) entrada de gas, (17) salida de gas, (18) sensor de H_2S , (19) controladores de flujo másico y (20) cilindros de gas.

La alimentación de gas fue realizada por la parte superior del BTF (operación en paralelo), a partir de una mezcla de gases industriales (Abello Linde S.A, España) de N_2 y H_2S , cuyos caudales fueron regulados

por controladores de flujo másico (F-201 CV, Bronkhorst High-Tech B.V., Países Bajos), lográndose un alto grado de precisión en la concentración de la mezcla de gases de trabajo (Fig. 6).

3.1.1 Medio mineral.

Se usó un medio mineral a partir del medio de cultivo ATCC 1255 recomendado para el crecimiento de *Sulfurimonas denitrificans* ATCC 33889. La composición del medio mineral fue (g L^{-1}): NH_4Cl (1), K_2HPO_4 (2), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,8), disolución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2 g en 1 L de H_2SO_4 (0,1 N)) (10 mL L^{-1}) y la disolución de elementos trazas (SL-4) (5 mL L^{-1}). A su vez, la composición de la disolución SL-4 fue: EDTA ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,2 \text{ g L}^{-1}$) y la disolución de elementos trazas SL-6 (100 mL L^{-1}). La composición de la disolución SL-6 (g L^{-1}), fue: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,03), H_3BO_3 (0,3), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,2), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,01), $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,02), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,03). Adicionalmente, el medio mineral fue enriquecido con el correspondiente aceptor de electrones (NaNO_3 o NaNO_2), según el experimento que fuese llevado a cabo, y fue usado NaHCO_3 $1,78 \text{ (g L}^{-1}\text{)}$ como fuente de carbono.

3.1.2 Inoculación.

La inoculación se realizó a partir de 0,3 L de agua residual del sistema de tratamiento primario, proveniente de la estación depuradora de aguas residuales (EDAR) “El Torno”, en el municipio de Chiclana (Cádiz-España). Se adicionó medio mineral, hasta completar un volumen de 3,5 L en recirculación, siguiendo el procedimiento descrito por Almenglo *et al.* (2016). Según este protocolo, la dosificación de nitrato se lleva a cabo manual en modo de operación discontinuo con una concentración en el líquido de recirculación de $2,25 \text{ g N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$. Este procedimiento fue

llevado a cabo durante 24h con el objetivo de iniciar el desarrollo de la biopelícula sobre el soporte.

Durante los 49 días posteriores, se implementó el sistema de control para la adición de nitrato basado en el valor del ORP. Procediendo de manera similar a como se describe en el apartado 3.5.3, teniendo como *set point* -330 mV. Se realizaron descargas del 35% del medio mineral, y cargas de medio mineral concentrado en nitrato ($2,8 \text{ gN-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$) hasta alcanzar una concentración de $1 \text{ gN-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$, en el líquido de recirculación. Mediante la reposición parcial del medio, se garantizó la presencia de microorganismos en el medio mineral remanente y, por ende, la continuidad de la etapa de inoculación. La duración total de la etapa de inoculación fue de 57 días. El resto de parámetros fueron:

- TLV constante de 10 m h^{-1} .
- pH entre 6,8-6,9.
- EBRT de 180 s, con un caudal de gas 1 L min^{-1} .
- Carga de entrada de H_2S de $71 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (concentración de H_2S de 1800 ppm_v) durante las primeras 20 h de la inoculación, y a partir de ese tiempo se mantuvo constante en $131 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (concentración de H_2S de 3300 ppm_v).

El seguimiento del proceso de inoculación se llevó a cabo a partir de los resultados de la determinación de nitrato, nitrito y sulfato en medio líquido y la cuantificación del consumo de H_2S en la corriente gaseosa.

A modo de resumen, todo el trabajo experimental incluido en este trabajo y las correspondientes variables de operación, se muestran en la tabla 6, la cual servirá de guía en la descripción de los apartados que serán explicados posteriormente.

Tabla 6 Resumen de experimentos y condiciones de operación.

Experimento	t (d)*	H ₂ S _{in} (ppmv)	TLV (m h ⁻¹)	IL (gS m ⁻³ h ⁻¹)	Aceptor de electrones	Operación
Control anticipado	171-176	710-3564	10	28,1-141,1	NO ₃ ⁻	Continuo
Ajuste del día 177	177-178	1900-2280	15	79,8-95,8	NO ₃ ⁻	Continuo
Cambios de set point	216-217	1900	15	79,8	NO ₃ ⁻	Continuo
Periodo (I)	285-301	1900	15	79,8	NO ₃ ⁻ / NO ₂ ⁻	Continuo
Ajuste del día 311	311	2280	15	95,8	NO ₂ ⁻	Continuo
Perturbaciones	Escalera	341-355	710-3564	15	28,1-141,1	NO ₂ ⁻
	Escalera sinusoidal	370-376	2400-3200	15	100,8-134,4	NO ₂ ⁻
	Escalón y pico	376-378	1900-3800	15	79,8-159,6	NO ₂ ⁻
Cambios de set point	380-383	1900	15	79,8	NO ₂ ⁻	Continuo
Control por ORP	383-384	952-1900	15	40,0-79,8	NO ₂ ⁻	Discontinuo

Tabla 6 Resumen de experimentos y condiciones de operación (continuación).

Experimento	t (d)*	H ₂ S _{in} (ppm _v)	TLV (m h ⁻¹)	IL (gS m ⁻³ h ⁻¹)	Aceptor de electrones	Operación
Periodo (II)	385-391	1900	15	79,8	NO ₂ ⁻ / NO ₃ ⁻	Continuo
Ajuste del día 393	393	2280	15	95,8	NO ₃ ⁻	Continuo
Perturbaciones	Escalera	393-397	710-3564	15	28,1-141,1	NO ₃ ⁻
	Escalera sinusoidal	397-410	1900-3800	15	79,8-159,6	NO ₃ ⁻
	Escalón y pico	411-421	2400-3200	15	100,8-134,4	NO ₃ ⁻
	Control por ORP	421-423	952-1900	15	40,0-79,8	NO ₃ ⁻
Periodo (III)	436-442	1900	15	79,8	NO ₃ ⁻ / NO ₂ ⁻	Continuo
Ajuste del día 445	445	2280	15	95,8	NO ₂ ⁻	Continuo
Cambios de EBRT	490-497	180-1000	15	39,8-110,5	NO ₂ ⁻	Continuo
Control anticipado	497-503	710-3564	15	28,1-141,1	NO ₂ ⁻	Continuo

* tiempo desde la inoculación

3.2 Sistema de control.

En este apartado se describen todos los aspectos relacionados con el diseño y la implementación del sistema de control, que ha permitido llevar a cabo el grueso del trabajo experimental. El sistema de control ha sido desarrollado en la plataforma LabVIEW® (LabVIEW® 2016, National Instruments™, USA). Este *software* está basado en un lenguaje de programación específico de sistemas de adquisición de datos y control instrumental. El sistema ha permitido desarrollar toda la arquitectura del control, a partir de la gestión de entradas y salidas del sistema de tipo analógicas y digitales.

La gestión de dichas señales (analógicas y digitales), fue llevada a cabo con tres módulos:

- Módulo de entrada de corriente analógica ($\pm 21,5$ mA), de 16 canales (NI-9208, National Instruments™, USA).
- Módulo de salida analógica (± 10 V), de 16 canales (NI-9264, National Instruments™, USA).
- Módulo de entradas y salidas digitales (24 V), de 16 canales cada una (NI-9375, National Instruments™, USA).

Los tres módulos fueron acoplados a un chasis NI cDAQ-9184 (NI CompactDAQ Ethernet, National Instruments™, USA), diseñado para medidas de sensores y señales eléctricas.

El programa de control desarrollado, que es denominado instrumento virtual, se compuso de dos partes (Johnson y Jennings, 2006):

Panel de control (interfaz de usuario): Esta herramienta (Anexo 1), permitió la visualización en tiempo real de los principales parámetros de operación: tiempo, pH, ORP, caudal de entrada de H₂S, caudal de la bomba de alimentación del aceptor de electrones y concentración de salida de H₂S. Esta interfaz, también permitió definir los valores de control del sistema: valores de *set point*, constantes de controladores, tiempo de actuación de bombas etc.

Diagrama de bloques: Constituye la arquitectura del control en sí. Mediante el cual se realizó la programación específica para cada modo de

operación, con la interconexión de elementos, funciones, estructuras, etc. (Anexo 2).

La lectura y adquisición de datos fue realizada cada dos segundos para disminuir el efecto del tiempo de lectura-tiempo de actuación en el registro del sensor de H₂S, sobre el sistema de control, la programación llevada a cabo permitió el registro de datos en archivo de extensión “csv”.

3.2.1 Arquitectura de programación en LabVIEW®.

Las entradas analógicas que se han manejado en el control del proceso, han sido señales de 4-20 mA:

- Señal del sensor de H₂S.
- Señal del sensor de pH.
- Señal del sensor de ORP.
- Señal de los controladores de caudal másico.

Respecto a las salidas analógicas, cabe decir que solo una señal de este tipo en el rango de 0-10 V fue utilizada en el esquema de control. Esta señal, fue empleada en la regulación de la bomba empleada para la alimentación de medio mineral, y por ende la concentración del aceptor de electrones correspondiente (nitrato/ nitrito), que fue la variable manipulada en todos los experimentos llevados a cabo en régimen continuo.

Los valores de estas señales no solo fueron registrados continuamente, mediante el sistema de adquisición de datos, sino también fueron fundamentales para ejecutar los bloques específicos del sistema de control.

La gestión de dichas señales fue llevada a cabo dependiendo del modo de operación y del experimento que se deseaba realizar. Tal es el caso de la señal analógica de pH, que permitió la ejecución del bloque de control de este parámetro (Anexo 3), que reguló la actuación de las bombas de dosificación de ácido y base, para lograr el ajuste al valor de *set point* establecido.

En la dosificación manual fue posible definir un valor del voltaje de la bomba de dosificación, que previamente fue calibrada relacionando

dicho voltaje con el caudal real de la bomba. Este código descrito en el anexo 4, muestra que el voltaje varió en un rango entre 1-10 V, debido a las características de la bomba empleada.

Para el control retroalimentado, la programación integró un diagrama de bloques para un controlador PID. Dicho diagrama permitió definir las ganancias de los controladores (P, PI o PID) empleados en los experimentos (Anexo 5). En este instrumento virtual, fue incluida la función de transferencia del controlador. Mediante la comparación entre la señal del sensor (concentración de salida de H_2S) y el valor del *set point* deseado, se determinó el error entre ambos valores, el cual decide la actuación sobre la salida analógica para la bomba de dosificación del aceptor de electrones, con el objetivo de disminuir el valor de este error.

El diagrama de bloques para el control anticipado (Anexo 6), incluyó una función matemática para establecer la ratio $N:S_{in}$ que haya sido objetivo de estudio. Dicha función permitió la variación del voltaje de la bomba de alimentación del aceptor de electrones, en función de la concentración de entrada de H_2S , definida por el caudal de entrada (controlador másico de H_2S).

El instrumento virtual para el control por ORP (Anexo 7), incluyó la opción de fijar el valor de *set point* de ORP, así como el tiempo de actuación de la bomba de dosificación de la disolución concentrada de aceptor de electrones y medio mineral. A partir de la señal analógica procedente del Multimeter 44, se habilitó una salida digital para la activación de la bomba de descarga y/o carga de medio mineral (Apartados 3.1.2 y 3.5.3).

Otro instrumento virtual fue creado para seleccionar el modo de variación de la carga de entrada, variando el caudal de H_2S en la mezcla de gases de entrada, según fuese requerido en los experimentos. Incluyó tres opciones: manual, o las funciones matemáticas correspondientes: función escalera (Anexo 8) o función escalera sinusoidal (Anexo 9).

3.3 Ajuste y selección de controladores.

Fueron seleccionados tres métodos de ajuste de controladores, sobre la base de que ninguna regla de sintonía funciona bien para todos los sistemas (Yu, 2006).

Dos de estos métodos a partir de la respuesta del sistema ante una entrada en escalón, aplicando en el primero de ellos las reglas de Ziegler-Nichols y en el segundo el método aproximado de optimización de la ganancia integral con sensibilidad limitada (AMIGO). Este último, puede ser aplicado, a procesos con diferentes comportamientos dinámicos (Åström *et al.*, 2004).

Para el tercer método de ajuste fueron utilizadas las reglas de Ziegler-Nichols, a partir de los parámetros obtenidos de la oscilación mantenida del sistema.

3.3.1 Ajuste de controladores. Entrada en escalón.

A partir de una de las reglas de Ziegler-Nichols, se desarrolló este método, el cual se basa en que la mayoría de los procesos tiene una respuesta monótona creciente estable ante una entrada tipo escalón al sistema. Experimentalmente se procede a provocar un salto en la entrada, y se registra la salida hasta que alcance nuevamente el estado estacionario (Åström *et al.*, 1995).

Partiendo de este hecho, se determina el punto en el que la pendiente de la respuesta tiene su máximo, posteriormente se traza la tangente en este punto y se determinan los parámetros: ganancia (K), tiempo de retardo (L) y tiempo constante (T), (Fig. 7).

Tras ser estimados estos parámetros, se calculan las constantes específicas de cada controlador mediante ecuaciones matemáticas (Tabla 7) (Hägglund y Åström, 2002; Åström y Hägglund, 2004).

Las ecuaciones más utilizadas son las de Ziegler-Nichols (Tabla 7). No obstante, a partir de la respuesta-escalón, es posible calcular las

constantes de control por otros métodos (Silva *et al.*, 2003; Gude y Kahoraho, 2012). En la presente Tesis se ha optado por aplicar el método de AMIGO, que se basa en las modificaciones realizadas por Hägglund y Åström (2002). Dicho método consiste en maximizar la ganancia integral restringiendo al máximo la sensibilidad, y fue obtenido a partir del descubrimiento de relaciones muy simples entre los parámetros del proceso y los del controlador. Se ha seleccionado este método dado que, tras ser comparado con otros métodos de ajuste, proporciona resultados significativamente mejores y controladores ajustados con buenas propiedades de rendimiento y robustez (Vilanova *et al.*, 2010; Awouda y Mamat, 2010; Eriksson y Johansson, 2007).

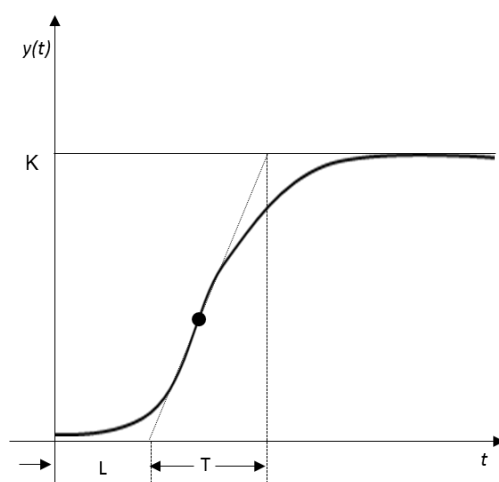


Figura 7. Respuesta ante entrada en escalón y procedimiento para determinar los parámetros K , L y T .

Como se ha abordado anteriormente, en los resultados que se obtienen de este método de ajuste se basan las fórmulas de Ziegler-Nichols (laço abierto) y AMIGO. Para llevarlo a cabo, fue realizado un cambio del 20%, en la concentración de entrada de H_2S , desde 1900 a 2280 ppm_v (IL de 79,8 a 95,8 gS- H_2S m⁻³ h⁻¹) y se mantuvo la medición en continuo de la concentración de H_2S de salida (variable de control).

Tabla 7 Cálculos de parámetros de controladores por método de entrada en escalón.

		Ziegler-Nichols			AMIGO	
		PID	PI	P	PID	PI
Ganancia proporcional (k_p)		$\frac{1,2T}{KL}$	$\frac{0,9T}{KL}$	$\frac{T}{KL}$	$\frac{0,2 + 0,45 \frac{T}{L}}{K}$	$\frac{0,25T}{KL}$
Tiempo integral (τ_i)		$2L$	$3L$	-	$0,4L + \frac{0,8T}{L + 0,1T}L$	$0,8T$
Tiempo derivativo (τ_D)	derivativo	$\frac{L}{2}$	-	-	$\frac{0,5LT}{0,3L + T}$	-

A partir de los valores de tiempo integral y derivativo, pueden ser estimadas las correspondientes ganancias con las ecuaciones siguientes:

$$k_i = \frac{k_p}{\tau_i} \quad (Ec.11)$$

$$k_d = k_p * \tau_D \quad (Ec.12)$$

3.3.2 Ajuste de controladores. Oscilación mantenida.

También llamado método de frecuencia-respuesta o método de la última ganancia, tiene de igual forma sus orígenes en los estudios realizados por Ziegler y Nichols (1942).

Estos autores introdujeron este método que se basa en la frecuencia de respuesta de un sistema con un control proporcional. El procedimiento consiste en incrementar el valor de la ganancia proporcional hasta que el sistema se manifiesta críticamente estable (oscilaciones mantenidas). Llegado a este punto se registran el valor de la ganancia (K_U) y del período de las oscilaciones (T_U), (Fig. 8). Una vez determinados estos valores, se

calculan los parámetros específicos de cada controlador por ecuaciones matemáticas simples (Cominos y Munro, 2002).

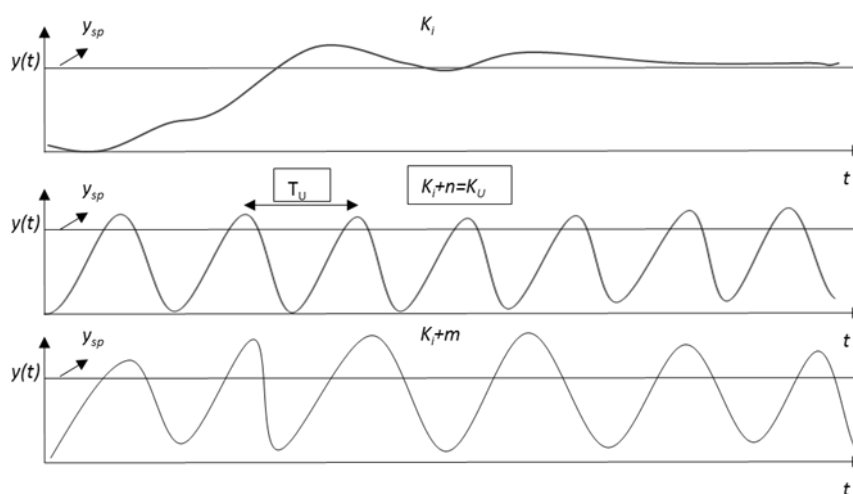


Figura 8. Respuesta de un sistema de control proporcional, para el aumento progresivo de la ganancia (k_p) del controlador con un valor de set point (y_{sp}) definido. Adaptado de Stephanopoulos (1984).

El procedimiento experimental se llevó a cabo con un control retroalimentado, bajo la acción única de la ganancia proporcional (controlador P).

Se trabajó a una carga de H_2S de entrada constante, IL de $95,8 \text{ gS-}H_2S \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (concentración de entrada de H_2S de 2280 ppm_v), y se procedió a variar el valor de la ganancia proporcional de forma manual, probándose los siguientes valores: 0,05, 0,018, 0,015, 0,012, 0,011 y 0,01. Hasta obtener una oscilación mantenida en el tiempo, que permitió estimar los valores de la ganancia final y el período final conforme a las ecuaciones que se muestra en la Tabla 8 (Hang *et al.*, 1991).

Tabla 8 Cálculos de parámetros de controladores por método de oscilación mantenida.

Parámetros	PID	PI	P
Ganancia proporcional (k_p)	$0,6K_U$	$0,45K_U$	$0,5K_U$
Tiempo integral (τ_I)	$0,5T_U$	$0,85T_U$	-
Tiempo derivativo (τ_D)	$0,125T_U$	-	-

3.3.3 Criterios de selección de controladores.

Para seleccionar el mejor controlador (PID, PI o P) ajustado por los métodos (Ziegler-Nichols, AMIGO u oscilación mantenida) se han empleado criterios de selección.

Dichos criterios de selección, no solo deben estar relacionados con la respuesta de la variable de control respecto al *set point* ante un cambio que se produzca (Åström *et al.*, 2006), sino también deben estar relacionados con los parámetros del proceso para proporcionar un control efectivo (Perry y Green, 2008).

3.3.3.1 Criterios basados en el tiempo integral.

Criterios basados en la interpretación del error integral entre la variable de control y el valor de *set point*, entre los más empleados están: integral del error cuadrado (ISE), integral del error absoluto (IEA) e integral del tiempo y del error absoluto (ITAE) (Stephanopoulos, 1984).

Integral del error cuadrado: El criterio ISE se basa en la integración del error cuadrado a lo largo del tiempo, y tiene una mayor penalización de los valores mayores de error respecto a los valores menores. Aquellos sistemas que sean optimizados por el menor valor de este criterio tienden a eliminar los grandes errores del sistema, pero se tolera la acción de los pequeños (Rivera *et al.*, 1986). Cabe añadir que es el método más usado y se define según:

$$ISE = \int_0^{\infty} \epsilon^2(t) dt \quad (Ec.13)$$

Integral del error absoluto: Respecto a este criterio, cabe destacar que no discrimina entre los errores presentes en la respuesta del sistema. Empleando este criterio se tiende a la selección de un controlador con una respuesta más lenta y generalmente con una oscilación menos sostenida en el tiempo que si se aplica el criterio ISE (Yu, 2006). Se define por la ecuación:

$$IAE = \int_0^{\infty} |\epsilon|(t) dt \quad (Ec.14)$$

Integral del tiempo y el error absoluto: Este criterio integra el error absoluto en el tiempo multiplicado por el tiempo. De esta forma se

consideran con mayor influencia, los errores que perduran después de cierto tiempo en el sistema, respecto a los errores que inicialmente se han producido. Los controladores que sean seleccionados teniendo en cuenta este criterio suelen alcanzar condiciones estables en menos tiempo que los otros criterios. El inconveniente es que a veces la selección basada en este criterio, también puede resultar en sistemas con una respuesta inicial lenta (López, 2016). Se define según:

$$ITAE = \int_0^{\infty} t|\epsilon|(t)dt \quad (Ec.15)$$

Para una efectiva comparación, se requiere realizar el mismo experimento para evaluar cada controlador, evaluándose las integrales en un mismo período de tiempo finito, pero suficiente para la estabilización de las respuestas.

Por eso, a pesar de la aceptación de estos criterios, es imposible aislar al sistema de perturbaciones aleatorias que lo afecten durante un experimento. Dichas perturbaciones afectarán la salida del proceso y, por lo tanto, modificarán las medidas de error.

3.3.3.2 Criterios basados en la evaluación de la respuesta del sistema.

Este criterio de selección, utilizó el comportamiento de la variable de control: la concentración de salida de H₂S y se basó en la respuesta dinámica del proceso teniendo en cuenta aspectos como: *offset*, tiempo de estabilización (variación del valor del *set point* entre 2-5%) (Lipták, 2006), valor medio de la variable de salida y grado de oscilación.

3.4 Cambios del aceptor de electrones.

Los cambios progresivos del aceptor de electrones se realizaron para el estudio y análisis de la operación del BTF, la evaluación del sistema de

control y el estudio del comportamiento de las poblaciones ante estos cambios. Tres cambios entre aceptores de electrones (nitrato-nitrito) fueron llevados a cabo (Tabla 6), y cada uno de ellos se realizó a una carga de entrada constante de $79,8 \text{ g S-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (1900 ppm_v).

3.4.1 Cambio de nitrato a nitrito. Periodo (I).

El primer cambio se hizo después de 286 días de operación del BTF con nitrato como aceptor de electrones. El cambio a nitrito se llevó a cabo gradualmente durante 16 días. La carga total de nitrógeno fue de $0,10 \pm 0,02 \text{ g h}^{-1}$. El proceso de cambio se llevó a cabo mediante un control retroalimentado PID ajustado por el método de la oscilación mantenida (Tabla 6: Ajuste del día 177), con un *set point* de 100 ppm_v de H₂S a la salida. Este mismo modo de control fue empleado en el período (II) y (III).

3.4.2 Cambio de nitrito a nitrato. Periodo (II).

El segundo cambio se hizo 80 días después de realizar el primer cambio de aceptor de electrones, y, por ende, de estar operando con nitrito. Se procedió a cambiar progresivamente el aceptor de electrones a nitrato durante un período de 6 días (del día 385 al 391), teniendo en cuenta que, durante el período I el proceso transcurrió satisfactoriamente sin que el control del equipo fuese afectado. Fue llevado a cabo con una carga total de nitrógeno de $0,07 \pm 0,01 \text{ g h}^{-1}$. Al terminar este cambio, un nuevo ajuste del controlador PID fue realizado solamente por el método de oscilación mantenida (Tabla 6: Ajuste del día 393).

3.4.3 Cambio de nitrato a nitrito. Periodo (III).

El tercer y último cambio en el aceptor de electrones se realizó 45 días después del segundo, se realizó de nitrato a nitrito en el transcurso de seis días (del día 436 al 444). Se llevó a cabo con una carga total de nitrógeno de $0,09 \pm 0,03 \text{ g h}^{-1}$. Durante el proceso el sistema estuvo siendo controlado con las ganancias el controlador PID ajustado por oscilación mantenida utilizado tras concluir el cambio de nitrito a nitrato. Al terminar este periodo, se volvió a realizar un nuevo ajuste de los controladores (Tabla 6: Ajuste del día 445) descritos en los apartados 3.3.1 y 3.3.2.

Durante los tres procesos de cambios de aceptor de electrones se tomaron muestras de líquido diarias para el análisis de los iones nitrato, nitrito y sulfato y se registró la variable controlada (concentración de salida de H_2S) a lo largo de todo el período de tiempo en el que trascurrieron los mismos.

3.5 Estrategias de control.

Para cada uno de los estudios realizados con los distintos modos de control (anticipado y retroalimentado) y perturbaciones correspondientes (Fig. 9), fue llevado a cabo un experimento sin control, en el cual se mantuvo constante el caudal del aceptor de electrones y por tanto la carga de nitrógeno alimentada al sistema. Estos experimentos sin control, permitieron realizar una comparación con el respectivo experimento con control.

Las perturbaciones relacionadas con cambios en la carga de entrada y/o concentración de entrada de H_2S fueron:

- Función escalera (Fig. 9a):

Este perfil ha sido previamente estudiado por López *et al.* (2016) en un biofiltro percolador aerobio. Se ha utilizado el mismo perfil de carga de entrada de H_2S con el objetivo de poder comparar ambos sistemas, tanto con control anticipado como retroalimentado. A un EBRT constante de 117

s con ciclos repetitivos de 14h. La concentración de entrada de H₂S varió desde 710 hasta 3564 ppm_v (carga de entrada de H₂S desde 28,1 hasta 141,1 gS-H₂S m⁻³ h⁻¹), en sintonía con los valores de concentración de H₂S que pueden ser alcanzados en una planta de tratamiento de aguas residuales (Papurello *et al.*, 2012).

-Pico de carga de entrada (Fig. 9b):

Se aumentó la carga de entrada de H₂S de 79,8 a 159,6 gS-H₂S m⁻³ h⁻¹ (aumento de la concentración de entrada de H₂S de 1900 a 3800 ppm_v), durante 1 minuto a un EBRT de 117 s.

-Entrada en escalón (Fig. 9c):

El aumento de la carga de entrada de H₂S fue de 79,8 a 95,8 gS-H₂S m⁻³ h⁻¹, llevándose por tanto un cambio en la concentración de entrada de H₂S de 1900 a 2280 ppm_v. El EBRT fue de 117 s.

-Escalera sinusoidal (Fig. 9d):

El perfil que describe esta función (Fig. 9d), simula los mayores valores de la concentración de H₂S de entrada que en determinados periodos pueden producirse en una planta de tratamiento de aguas residuales (Tomàs *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2014). La ecuación 16 muestra la función seno utilizada. "t" es el tiempo en horas, el período fue de 24 horas, el valor medio de H₂S fue de 2800 ppm_v y la amplitud de la oscilación de 400 ppm_v. Los cambios en la concentración de H₂S de entrada fueron discretos y se realizaron cada media hora. El *set point* de la variable controlada fue de 100 ppm_v.

$$H_2S_{in} = 400 \sin\left(\frac{2\pi}{24} t\right) + 2800 \quad (Ec.16)$$

-Escalera sinusoidal aplicada en el estudio de cambios de EBRT empleando nitrito como aceptor de electrones (Fig. 9e) (Apartado 3.5.4):

Esta variación de la concentración de entrada de H₂S tuvo un período de 24 horas, y a diferencia de la descrita anteriormente (Fig. 9d), este perfil estudió valores más bajos de concentración de H₂S de entrada (180-1000 ppm_v), en el orden de valores que se pueden encontrar en plantas de tratamiento de residuos sólidos urbanos (Papurello *et al.*, 2012). Esta perturbación tuvo un valor medio de la concentración de entrada de H₂S de 590 ppm_v, una amplitud de la oscilación de 410 ppm_v y un *set point* de la

variable de salida de 15 ppm_v. Con la disminución del valor del *set point*, se pretendió conocer el comportamiento del sistema de control, para reducir la concentración de salida de H₂S (15 ppm_v) a valores que permitan su utilización en celdas de combustible (inferior a 20 ppm_v) (National Energy Technology Laboratory, 2004). Nuevamente, los cambios en la concentración de H₂S de entrada fueron discretos y se realizaron cada media hora de acuerdo con la ecuación (Ec.17).

$$H_2S_{in} = 410 \sin\left(\frac{2\pi}{24}t\right) + 590 \quad (Ec.17)$$

Para los experimentos sin control empleando nitrato, la ratio N:S_{in} estuvo en el rango de 0,4-2,3 mol-N mol-S⁻¹. En cada uno de los subapartados siguientes se detallan las condiciones de operación del sistema sin control y con control anticipado o retroalimentado, según corresponda.

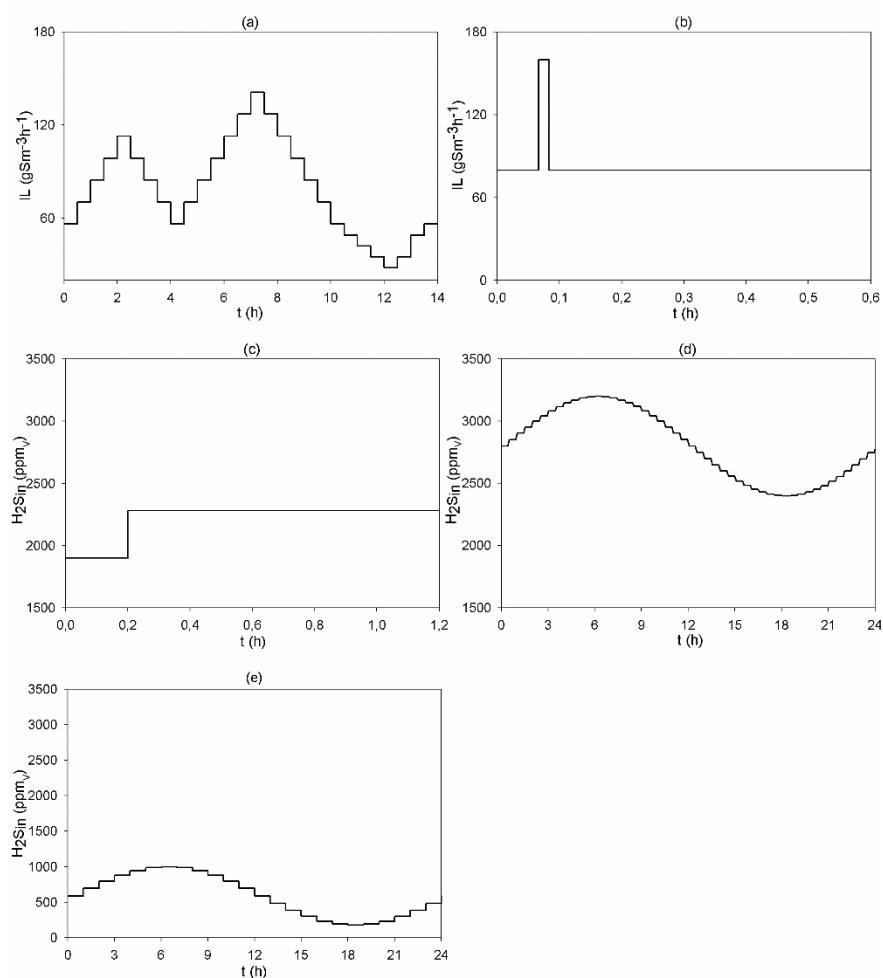


Figura 9. Perturbaciones realizadas para la carga y concentración de entrada de H_2S . (a) función escalera, (b) pico de carga de entrada, (c) escalón, (d) escalera sinusoidal, (e) escalera sinusoidal para cambios de EBRT.

3.5.1 Control anticipado.

El trabajo experimental, en la estrategia de control anticipado (Fig. 10), se realizó siguiendo el perfil de carga de entrada de H_2S de la figura 9a. El *set point* de la concentración de salida de H_2S fue de 100 ppmv. Los principales parámetros experimentales para los experimentos con y sin control se muestran en la tabla 9.

Tabla 9 Condiciones experimentales para la operación del BTF con nitrato y nitrito. Experimentos con y sin control anticipado.

$[H_2S]$ IL _{avg}	$[H_2S]$ IL _{max}	$[H_2S]$ IL _{min}	NO_3^-		NO_2^-	
			Q Cte.	Q variable	Q Cte.	Q variable
(g S- H_2S m ⁻³ h ⁻¹)	(g S- H_2S m ⁻³ h ⁻¹)	(g S- H_2S m ⁻³ h ⁻¹)	(L h ⁻¹)	(L h ⁻¹)	(L h ⁻¹)	(L h ⁻¹)
79,80	141,10	28,10	0,18	0,07-0,35	0,28	0,10-0,49

Para la estrategia de control anticipado se mantuvo constante la ratio $N:S_{in}$ en 0,8 mol-N mol-S⁻¹. Para ello se programó la bomba de nitrato que suministró un caudal variable desde 0,07-0,35 L h⁻¹, siendo la concentración de la disolución de nitrato de 0,38 g de N- NO_3^- L⁻¹.

Las condiciones de trabajo para el experimento sin control fueron: caudal de nitrato de entrada constante (0,18 L h⁻¹), alimentando el aceptor de electrones, con una concentración de entrada de nitrato de 0,38 g de N- NO_3^- L⁻¹.

El caudal de nitrato constante seleccionado, fue el correspondiente a la ratio $N:S_{in}$ de 0,8 mol-N mol-S⁻¹ para la carga media de 79,8 gS- H_2S m⁻³ h⁻¹. Por tanto, se trabajó a una ratio $N:S_{in}$ variable entre 0,40 a 2,00 mol-N mol-S⁻¹.

Estos mismos experimentos fueron realizados con nitrito como aceptor de electrones. Para el control anticipado se seleccionó una ratio $N:S_{in}$ estequiométricamente proporcional (Ec.3-6) a la empleada en el control anticipado con nitrato, aproximadamente un 60% superior a ese valor (0,8 mol-N mol-S⁻¹).

Con el objetivo de mantener esta ratio $N:S_{in}$ constante en 1,3 mol-N mol-S⁻¹, el caudal de la bomba de alimentación del medio mineral cambió

entre 0,10-0,49 L h⁻¹. Para el experimento sin control, el caudal de nitrato de entrada fue constante (0,28 L h⁻¹) y la concentración de nitrato fue de 0,46 g de N-NO₂⁻ L⁻¹, resultando por tanto una operación con ratio N:S_{in} variable entre 0,74 y 3,70 mol-N mol-S⁻¹.

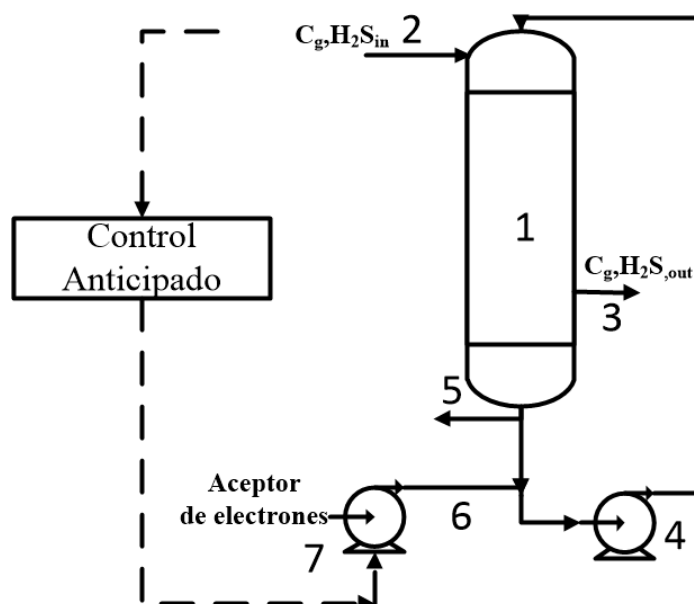


Figura 10. Esquema de la estrategia de control anticipado para el control de la carga de entrada de H₂S variable. (1) BTF, (2) entrada de gas, (3) salida de gas, (4) bomba de recirculación, (5) purga de líquido, (6) alimentación de medio mineral y aceptor de electrones, y (7) bomba de dosificación analógica.

3.5.2 Control retroalimentado. Perturbaciones.

Haciendo uso del controlador seleccionado (PID-OM), a partir de los resultados que se obtuvieron en el apartado 3.3, se evaluó el comportamiento del sistema de control bajo diferentes perturbaciones (Fig.

9), realizadas sobre la concentración de H_2S de entrada y ante cambios del EBRT y del valor del *set point* de la variable controlada.

Para todas las perturbaciones se analizó la respuesta del sistema sin control. En las perturbaciones de escalón y pico sin control, para ambos aceptores de electrones, el caudal de la bomba se mantuvo constante e igual al valor del caudal en el instante previo a la perturbación, para los respectivos experimentos con control.

En cambio, el caudal del aceptor de electrones para los experimentos con nitrato, en la variación en forma de escalera (Fig. 9a) y escalera sinusoidal (Fig. 9d), fue fijado según el mismo criterio empleado en el apartado 3.5.1.

Para la perturbación en forma de escalera, se mantuvo constante el valor del caudal de nitrato en $0,34 \text{ L h}^{-1}$, que es el necesario para tener una ratio N:S_{in} aproximada de $0,8 \text{ mol-N mol-S}^{-1}$ en la carga de entrada promedio de cada experimento. Para el caso de la escalera sinusoidal, se alimentó al sistema a $0,27$ y $0,39 \text{ L h}^{-1}$ de nitrato, que corresponden a una ratio de $0,48$ y $0,8 \text{ mol-N mol-S}^{-1}$, respectivamente.

Para estas mismas perturbaciones, operando con nitrito, se aumentó aproximadamente un 60% la cantidad de compuesto nitrogenado que entró al BTF, respecto a la operación con nitrato correspondiente. Manteniendo un caudal de nitrito constante de $0,45$ (ratio $0,70\text{-}3,53 \text{ mol-N mol-S}^{-1}$), para la escalera, mientras que en la escalera sinusoidal se mantuvo un caudal constante de $0,52 \text{ L h}^{-1}$ (ratio $1,11\text{-}1,50 \text{ mol-N mol-S}^{-1}$).

Además, fue estudiada la respuesta del sistema de control ante cambios en el *set point* de la variable de control. Estos cambios fueron realizados entre $25\text{-}200 \text{ ppm}_v$, para una concentración de H_2S de entrada constante de 1900 ppm_v (carga de entrada de $79,8 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$), con cambios tanto ascendentes como descendentes entre los valores analizados. Para la realización de este experimento, empleando nitrato como aceptor de electrones, se utilizó el controlador seleccionado (PID) del ajuste realizado (Tabla 6: Ajuste del día 177), en cambio, para el experimento con nitrito, se empleó el controlador seleccionado (PID) después del ajuste (Tabla 6: Ajuste del día 311).

Estas variaciones en las concentraciones de entrada y salida de H_2S , permitieron poner a prueba la robustez del sistema de control propuesto, ante diferentes escenarios operacionales.

3.5.3 Control retroalimentado por ORP.

Como parte del estudio de diferentes estrategias de control, ha sido evaluado el sistema de control propuesto por Almenglo *et al.* (2016). En este método, la alimentación del aceptor de electrones (nitrato) fue llevada a cabo en modo discontinuo usando un control retroalimentado y la medición del ORP como variable de control, con un volumen de recirculación de 3 L.

El procedimiento realizado se basa en que una vez la concentración del aceptor de electrones disminuye en el medio de recirculación, el valor ORP comienza a disminuir de forma extremadamente rápida. Al definir un valor de ORP como *set point*, una vez alcanzada esta condición, se adiciona determinado volumen de una disolución concentrada del aceptor de electrones correspondiente, lo cual conlleva a que el valor del ORP del sistema retorna progresivamente a los valores normales de trabajo. Operando a una carga de entrada de H_2S constante de $40 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, se establecieron dos valores de *set point* para el ORP en estos experimentos: -340 y -360 mV.

La concentración en el medio mineral del experimento con nitrato, fue de $10 \text{ g N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$, cuando el ORP alcanzó el valor del *set point*, se añadió 0,04 L de medio mineral con el fin de aumentar la concentración de nitrato en el medio de recirculación hasta $0,13 \text{ g N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$.

Para realizar este mismo experimento con nitrito como aceptor de electrones, se llevó a cabo un procedimiento similar al descrito empleando nitrato. La concentración de la disolución concentrada del medio mineral fue de $8,5 \text{ gN-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ y mediante la adición de 0,04 L, se obtuvo una concentración de $0,12 \text{ gN-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ en la recirculación después de cada pulso.

3.5.4 Cambios en el tiempo de residencia.

Para llevar a cabo este estudio se empleó el controlador seleccionado (PI) después de realizar el ajuste (Tabla 6: Ajuste del día 445). Este

experimento fue llevado a cabo, empleando nitrito como aceptor de electrones.

El estudio se realizó para tres EBRT: 117, 92 y 67 s. El perfil de carga de entrada de H_2S estudiado en estos experimentos, abarcó un rango específico para cada EBRT estudiado. Para 117s el valor de este rango estuvo entre $7\text{-}39 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, para el estudio a 92 s la carga de entrada varió entre $9\text{-}50 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y para el EBRT de 67 s IL se situó entre $12\text{-}69 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

3.6 Estudios de biología molecular.

3.6.1 Proceso de toma de muestras.

Las muestras para el análisis de las poblaciones microbianas fueron tomadas a partir de la selección aleatoria de anillos del lecho superior e inferior del BTF cada 48 horas, durante los experimentos de cambio de aceptor de electrones. Adicionalmente, se tomaron muestras durante la operación estable con cada uno de los aceptores de electrones, lo que se interpreta como una toma de muestra biológica en el instante antes de comenzar cada uno de estos cambios (Tabla 10).

Cada anillo se resuspendió en 25 mL de disolución salina ($\text{NaCl } 8 \text{ g L}^{-1}$) y fue sonicado usando un baño de ultrasonidos Ultrasons-H (Selecta, España) a 40 kHz durante 15 min, para permitir la desorción de los microorganismos inmovilizados.

La solución salina y los microorganismos en suspensión fueron centrifugados a 4°C , empleando una centrífuga (Sigma 6k10 Laborzentrifugen GmbH, Alemania) durante 15 min y una velocidad de centrifugado de $10000 \times g$ (Ramírez *et al.*, 2011). El sobrenadante fue desechado cuidadosamente y se pipeteó la biomasa para evitar el azufre

precipitado. El pellet resultante fue almacenado a -80 °C para la posterior extracción de ADN genómico total.

Tabla 10 Muestras biológicas tomadas.

Muestra	t (d)*	Experimento	Carga N-NO₃/N_{total} (%)	Carga N-NO₂/N_{total} (%)
0-I	285	Previo Período (I)	100,0	0,0
2-I	287	Período (I)	96,4	3,6
4-I	289		82,1	17,9
6-I	291		67,9	32,1
8-I	293		54,6	45,4
10-I	295		40,8	59,2
12-I	297		27,1	72,9
14-I	299		13,3	86,7
84-I	385	Período (II)	0,0	100,0
2-II	387		27,7	72,3
4-II	389		63,7	36,3
6-II	391		100,0	0,0
0-III	436	Período (III)	100,0	0,0
2-III	438		59,1	40,9
4-III	440		34,6	65,4
6-III	442		0,0	100
I-S-III	480	Fin Período (III)	0,0	100,0

* tiempo desde inoculación.

3.6.2 Extracción de ADN.

El pellet de biomasa se utilizó para la extracción de ADN genómico, empleando un kit comercial UltraClean Soil DNA Isolation (12224, MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante.

El ADN total extraído de cada muestra junto al extraído de los cultivos puros de *Thiobacillus denitrificans* DSM 12475, y *Sedimenticola selenatireducens* DMS 17993, empleados como controles positivos, se utilizaron como ADN molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de la región V3-V5 del gen ARNr 16S usando los primers universales GC-338F (5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') (Muyzer *et al.*, 1993) y 907R (5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3') (Yu y Morrison, 2004).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 25 µL, que contenía 1-2 µL de ADN, 0,5 µL de los primers directos e inversos (10 µM), 5 µL de tampón Hi-Fi 5X, 2,5 µL de dNTP's (2,5 µM), 0,75 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) (3%) y 0,125 µL de ADN polimerasa Velocity® (Bioline Reagents Ltd., Londres, Reino Unido). Los productos de PCR fueron purificados mediante el kit NucelSpin® gel (Macherey-Nagel, Düren, Germany GmbH & Co.).

La calidad del ADN genómico y los productos de PCR se verificaron mediante electroforesis de gel de agarosa (1%), TAE (40mM tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8,3) 0,5X y se cuantificaron por NanoDrop®, (Thermo Fisher Scientific, USA).

3.6.3 Análisis DGGE de los productos de PCR y extracción de ADN.

Las poblaciones de bacterias presentes en el BTF en el transcurso de los experimentos de cambio de aceptor de electrones, fueron evaluadas empleando DGGE, utilizando el sistema Dcode® (Biorad, Hercules, USA),

siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se cargaron, sobre un gel de poliacrilamida (6% p/v), 1 μg de los productos de PCR con un gradiente desnaturizante de 30-60%. La electroforesis se llevó a cabo durante 16 horas a voltaje y temperatura constantes de 90 V y 60 °C respectivamente, en una disolución amortiguadora de TAE 1X.

Los geles fueron revelados mediante inmersión en colorante bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) durante 10 minutos y posteriormente lavados en agua (10 min). A continuación, fueron visualizados y fotografiados utilizando un transiluminador ultravioleta BioDoc-It® (Ultra-Violet Products Ltd, UK).

Una vez analizadas, las bandas más representativas de ADN y consideradas de interés, se escindieron del gel de acrilamida y se transfirieron a un tubo con 50 μL de agua estéril. La extracción del ADN de la banda de acrilamida se realizó mediante el kit NucleoSpin Gel Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany GmbH & Co.) y se clonó mediante el kit de clonación pSpark® Universal DNA kit (Canvax, Biotech, Spain). Los productos de ligación se transformaron por choque térmico en células competentes con CaCl_2 de *E. coli* NZY55 α (NZTech., Lisboa, Portugal). El *screening* de los clones con el vector ligado, se realizó mediante PCR de colonia utilizando los primers universales T7 (primer directo) y M13 (primer inverso). Los clones positivos fueron aquellos donde se obtuvieron un tamaño de 800 pares de bases aproximadamente. Estos clones positivos fueron crecidos para el aislamiento del plásmido mediante el kit descrito anteriormente para la posterior secuenciación del inserto con el secuenciador 3730XL DNA (STABVida, Lisboa, Portugal). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias ubicadas en las bases de datos Nucleotide BLAST®.

3.6.4 Análisis del perfil de bandas del ADNr 16S de la comunidad microbiana.

Las similitudes dentro de la población microbiana entre los diferentes momentos y condiciones de operación seleccionados, así como los índices de diversidad y dominancia de cada muestra, se calcularon a

partir de perfiles de DGGE utilizando el software Bionumerics® (AppliedMaths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Mediante este software se realizó un perfil de densidad a través de cada carril y se obtuvo una curva de densitometría, se detectó cada banda y se calculó la contribución relativa de cada banda a la señal de banda total en cada carril. Posteriormente, se identificaron las bandas que ocupaban la misma posición relativa en los diferentes carriles del gel. Los patrones de bandas fueron normalizados con respecto a la banda de mayor intensidad (100%) y la menor intensidad (0,001%) de cada carril.

En la imagen del gel normalizada se realizó un ajuste de banda y se construyó una matriz para todos los carriles, teniendo en cuenta la presencia o ausencia de bandas individuales y la contribución relativa de cada banda (en porcentaje) a la intensidad total del carril. Para evaluar las similitudes entre los perfiles completos, se calculó una matriz de distancia utilizando el coeficiente de correlación de Pearson y, consecuentemente, se obtuvo un dendrograma que comparó las muestras mediante el método cluster de vinculación dentro de los grupos, con el software IBM® SPSS v.12.

Para el análisis de la diversidad de las asociaciones bacterianas, se calculó el índice de diversidad general de Shannon-Wiener (H) (Spellerberg, 2008), según la ecuación:

$$H = - \sum_{i=1}^{i=n} p_i \ln p_i \quad (Ec.18)$$

Donde p_i es la probabilidad de importancia de las bandas en una pista, y n es el número de bandas en la muestra. La probabilidad de importancia p_i es la intensidad relativa de la i -ésima banda calculada como:

$$p_i = \frac{n_i}{\sum n_i} \quad (Ec.19)$$

En esta ecuación, n_i es la altura del pico i en la curva de densitometría.

Y también fue calculado el índice de dominancia de Simpson (S), según (Keylock, 2005), empleando la siguiente ecuación:

$$S = \sum_{i=1}^{i=n} p_i^2 \quad (Ec.20)$$

3.7 Métodos analíticos.

3.7.1 Análisis de muestras líquidas.

Para la fase líquida, los aniones (NO_3^- , NO_2^- , Cl^- y SO_4^{2-}), presentes en las muestras fueron cuantificados con un sistema de cromatografía iónica (Metrohm, 930 Compact IC Flex, Suiza), equipado con detección conductimétrica y una columna Metrosep A Supp 5-250/4,0. La separación de los distintos aniones se llevó acabo usando como eluyente la mezcla: Na_2CO_3 (3,2 mM) y NaHCO_3 (1,0 mM) a un flujo isocrático de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$.

La concentración de aniones carbonato (CO_3^{2-}) e hidrogeno carbonato (HCO_3^-), fue determinada por el método de alcalinidad, descrito por Clesceri *et al.*, (1999).

3.7.2 Análisis de muestras gaseosas.

Para todas las mediciones en fase gaseosa, se utilizó la cromatografía gaseosa (GC-450, Bruker, España). Este equipo acoplado a un detector de conductividad térmica (TCD) y una columna (Poraplot Q plot FS) de 25 m de longitud y 0,53 mm de diámetro, fueron empleados en la medición de concentraciones de H_2S superiores a 1000 ppmv y el método de cuantificación fue configurado según las siguientes condiciones:

- Temperatura del horno: 33°C (durante 2 min), y rampa de calentamiento de 33 a 80°C con una velocidad de $10^\circ\text{C min}^{-1}$.

- Temperatura del inyector y del detector: 150°C .

Las muestras con menores concentraciones de H_2S , en el rango 0-100 ppmv, fueron analizadas con el mismo equipo de cromatografía gaseosa, empleando un detector fotométrico de pulsos (PFPD) y una

columna capilar de sílice fundida (Wcot), de 30 m de longitud y 0,32 mm de diámetro, a las siguientes condiciones:

- Temperatura del horno: 35 °C (durante 1,5 min), y rampa de calentamiento de 33 a 80 °C con una velocidad de 15 °C min⁻¹.

- Temperatura del inyector: 250 °C.

- Temperatura del detector: 200 °C.

Por otra parte, la corriente de gas de salida del BTF ha estado monitoreada en línea con el uso de un sensor electroquímico de H₂S (Sure-cell, Euro-Gas Management Services, Reino Unido). Este sensor de H₂S tiene un rango de medición entre 0 a 200 ppmv, por lo que la corriente de biogás de salida del BTF se diluyó con aire (1,2 L min⁻¹) antes de pasar a través del sensor (Fig. 11). Lo cual permitió la lectura permanente de la variable controlada.

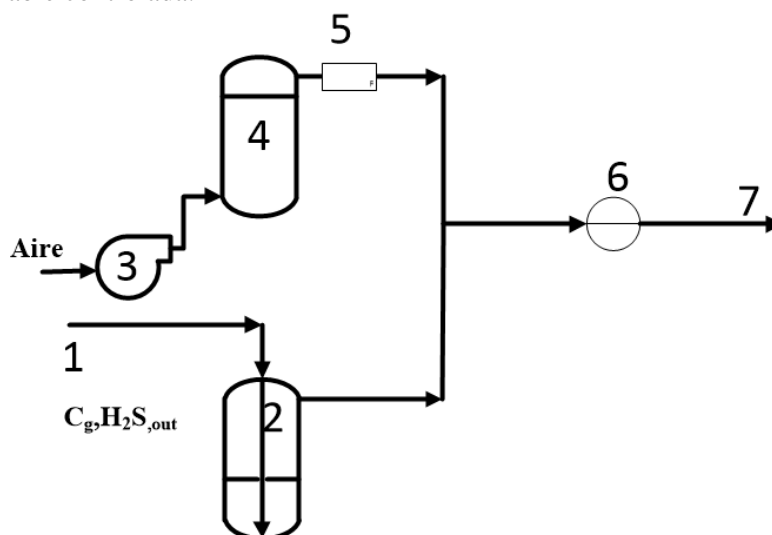


Figura 11. Esquema del sistema de medición en la corriente gaseosa de H₂S. (1) Salida gas BTF, (2) trampa de condensados, (3) compresor, (4) columna de humidificación, (5) caudalímetro, (6) sensor H₂S y (7) venteo.

3.7.3 Determinación de la concentración celular.

El recuento celular, en cámara de Neubauer, fue empleado para estimar la biomasa inmovilizada (Solera *et al.*, 2001). Se realizó el recuento de las células visibles en los cuatro cuadros que forman la diagonal de dicha cámara. La suma del recuento de cada diagonal equivale al número de bacterias presentes en la muestra, expresado en millones de células por mililitro. Siempre se procuró que el número de células contadas estuvieran en el rango de 5 a 12 en cada cuadrado.

Fueron realizadas varias réplicas y se realizó un promedio de los conteos realizados. Para lo que fue empleado un microscopio óptico (B1, Motic, Hong Kong), provisto de 5 objetivos de aumento, con una video cámara TK-1281(JVC, Japón), acoplada. Todos los recuentos celulares se realizaron al objetivo 40x.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Configuración y arranque del sistema experimental.

Los principales elementos del sistema diseñado para llevar a cabo todo el trabajo experimental de este estudio se muestran en la figura 12.

El arranque se llevó a cabo mediante la dosificación manual de nitrato en modo de operación discontinuo. Transcurridas las 12 primeras horas desde el arranque la concentración de salida de H_2S fue un 35% del valor de entrada con un valor casi constante del ORP ($-396,8 \pm 0,7$ mV) (Fig. 13), pudiendo ser debido a la solubilización del sulfuro en el medio de recirculación en lugar de la actividad biológica de la biomasa. El comportamiento del sistema fue evolucionando debido a la actividad sulfuro-oxidante de la biomasa hacia condiciones de eliminación más favorables, transcurridas 24 horas, alcanzándose valores superiores al 95% y valores de ORP superiores (-278 ± 2 mV).

Tras 24 horas desde la inoculación, se implementó la dosificación de nitrato en base al valor del ORP. Se obtuvo un perfil de concentración de salida típico de este modo de operación, con picos de H_2S , cuya concentración varió desde 21,2 hasta 142,3 ppm_v (Fig. 14). No obstante, a partir del día 9 la máxima concentración de H_2S que se alcanzó a la salida del BTF no superó las 60 ppm_v.

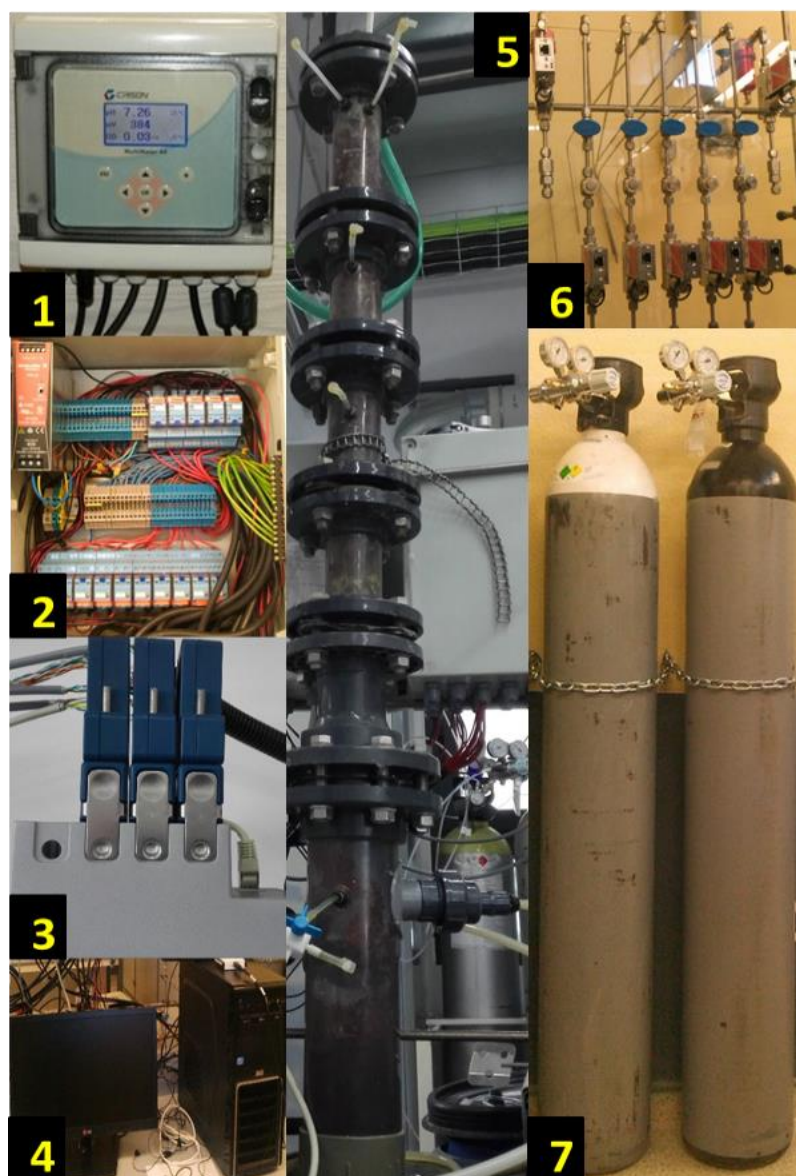


Figura 12. Elementos fundamentales de la instalación experimental. (1) multímetro 44, (2) cuadro eléctrico, (3) módulos de gestión de señales analógicas y digitales, (4) ordenador, (5) BTF, (6) controladores másicos y (7) cilindros de gas.

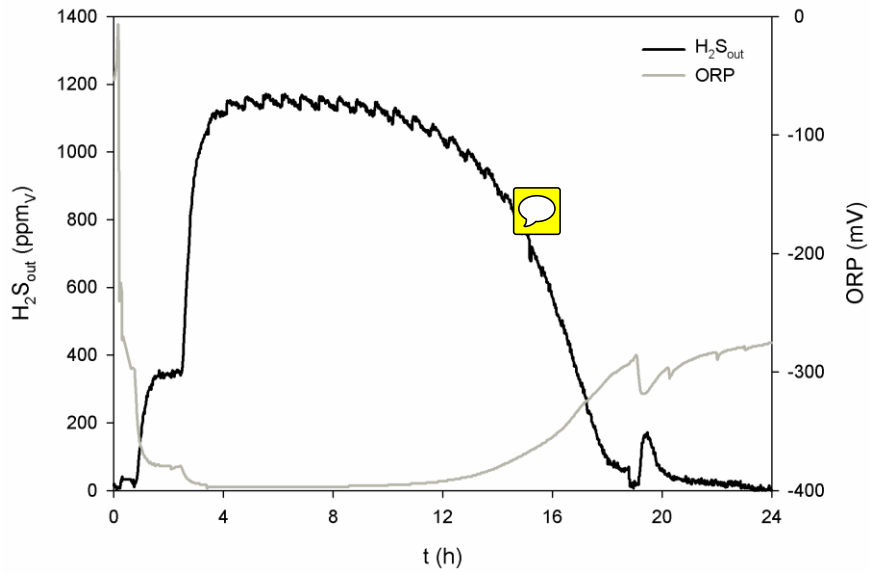


Figura 13. Evolución del BTF durante las primeras 24 h de inoculación (Almenglo *et al.*, 2016).

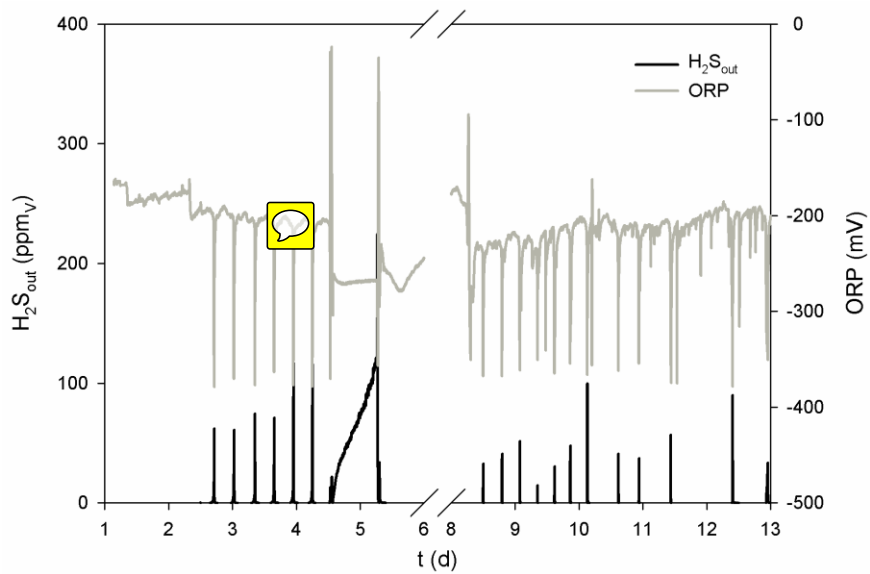


Figura 14. Concentración de H_2S_{out} y ORP durante la dosificación por valor de ORP de nitrato en la etapa de inoculación.

Transcurridos 50 días, se dio por concluida la etapa de inoculación. Como consecuencia de la inmovilización de los microorganismos en el soporte, fue posible apreciar una coloración rojiza a lo largo de todos los lechos del BTF. Dicha coloración es un aspecto coincidente con lo observado por Fernández (2011) y Almenglo *et al.* (2016) en BTFs anóxicos, de similares características. El color más intenso se observó en los lechos superiores del BTF (Fig. 15), coincidiendo con la zona donde se ponen en contacto la corriente gaseosa más rica en H_2S y la corriente líquida con mayor concentración de aceptor de electrones (nitrato), debido a la operación en paralelo del sistema.

Debido a la actividad sulfuro-oxidante de la biomasa en el BTF durante el período de inoculación se observó la aparición de depósitos de azufre elemental sobre el material de soporte (Fig. 15) y el porcentaje de eliminación de H_2S fue mayor del 95% para la carga de entrada de $131 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Resultados similares a los alcanzados por Montebello *et al.* (2012), quienes trabajaron a una carga de entrada crítica de $99,9 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, logrando un porcentaje eliminación de H_2S del 95%.

Al concluir la etapa de inoculación del BTF, la cantidad de biomasa inmovilizada fue de $9,1 \pm 0,4 \times 10^9$ células $(\text{g soporte seco})^{-1}$, en una muestra tomada en el lecho superior del BTF. Valor cercano al promedio obtenido en la operación a larga duración que fue de $2,0 \pm 0,8 \times 10^{10}$ células $(\text{g soporte seco})^{-1}$.



Figura 15. Lechos superiores y biomasa inmovilizada.

Estudios similares en sistemas anóxicos permiten realizar una comparación de este resultado (Tabla 11). Valores inferiores a los alcanzados en el presente estudio han sido referidos por Ziemiński y Kopycki (2016). Estos autores, realizaron el estudio de tres BTFs a escala piloto para el tratamiento de biogás (concentración de entrada de H_2S de 525 ppm_v), cada uno relleno con un material diferente: anillos de cerámica *Raschid*, anillos de polietileno de alta densidad y esferas de *keramzit* (agregado de arcilla expandida). Y llegaron a la conclusión de que la inmovilización celular fue similar para los tres BTFs, alcanzándose el mayor valor ($6,3 \pm 0,2 \times 10^8$ células (g soporte seco)⁻¹) en el lecho inferior del BTF relleno de anillos de polietileno.

Tabla 11 Valores de biomasa inmovilizada para BTFs anóxicos.

Soporte	Biomasa (células (g soporte seco) ⁻¹)	Referencia
OPUF	$2,8 \pm 0,3 \times 10^{10}$	(Fernández <i>et al.</i> , 2014)
Anillos Pall	$1,2 \pm 0,2 \times 10^{10}$	(Fernández <i>et al.</i> , 2013)
Anillos <i>Raschid</i> Anillos de polietileno Esferas de <i>keramzit</i>	$3,5 \pm 0,2 \times 10^3$ - $6,3 \pm 0,2 \times 10^8$	(Ziemiński y Kopycki, 2016)
Anillos Pall	$9,1 \pm 0,4 \times 10^9$ *; $2,0 \pm 0,8 \times 10^{10}$ **	Este estudio

* arranque ** larga operación

Por otro lado, valores de igual orden de magnitud que los determinados en el presente estudio fueron alcanzados por Fernández *et al.* (2014). Donde el conteo celular fue de $2,8 \pm 0,3 \times 10^{10}$ células (g soporte seco)⁻¹, al concluir la etapa de desarrollo y adaptación en un BTF relleno con OPUF, material que posee una superficie específica de $600 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$. De igual manera, en un sistema similar, pero empleando como material de lecho anillos Pall de polipropileno, con una superficie específica de $320 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$, Fernández *et al.* (2013), obtuvieron $1,2 \pm 0,2 \times 10^{10}$ células (g soporte seco)⁻¹, tras una etapa de arranque de 11 días. La comparación de los resultados de estos dos estudios corrobora el papel del material de empaque, en la inmovilización celular y la formación de la biopelícula. Por lo que, a pesar de las diferencias entre los cubos de OPUF y anillos Pall, fundamentalmente en cuanto a porosidad y superficie específica, en nuestro estudio, fue posible alcanzar prácticamente la misma cantidad de biomasa inmovilizada. A pesar de que algunos estudios indican que las características fundamentales de los materiales empleados en los lechos, como los anteriormente mencionados además de la capacidad de retención de humedad o la composición elemental (Gaudin *et al.*, 2008), influyen de forma significativa en el proceso de inmovilización celular.

4.2 Ajustes de controladores.

Durante toda la etapa experimental fueron realizados cuatro ajustes de las constantes de los controladores (Tabla 6). Éstos fueron motivados por los sucesivos cambios en el aceptor de electrones, al tenerse en cuenta que el reajuste de los controladores debe ser realizado siempre que se produzcan cambios en la dinámica del sistema (Hang *et al.*, 1991; Custódio *et al.*, 1999).

El ajuste de los días 177 y 445 fueron realizados por los métodos de la oscilación mantenida y del escalón. Mientras que los ajustes de los días 311 y 393 solo fueron llevados a cabo empleando el método de la oscilación mantenida.

Los resultados obtenidos en los cuatro ajustes de los controladores se exponen a continuación.

4.2.1 Lazo cerrado. Método de la oscilación mantenida.

La figura 16 muestra los ajustes que fueron realizados cuando el sistema trabajó con nitrato como aceptor de electrones. La tabla 12 muestra el rango de valores de la ganancia proporcional, así como la última ganancia y el último periodo que permite determinar este método, para cada ajuste realizado.

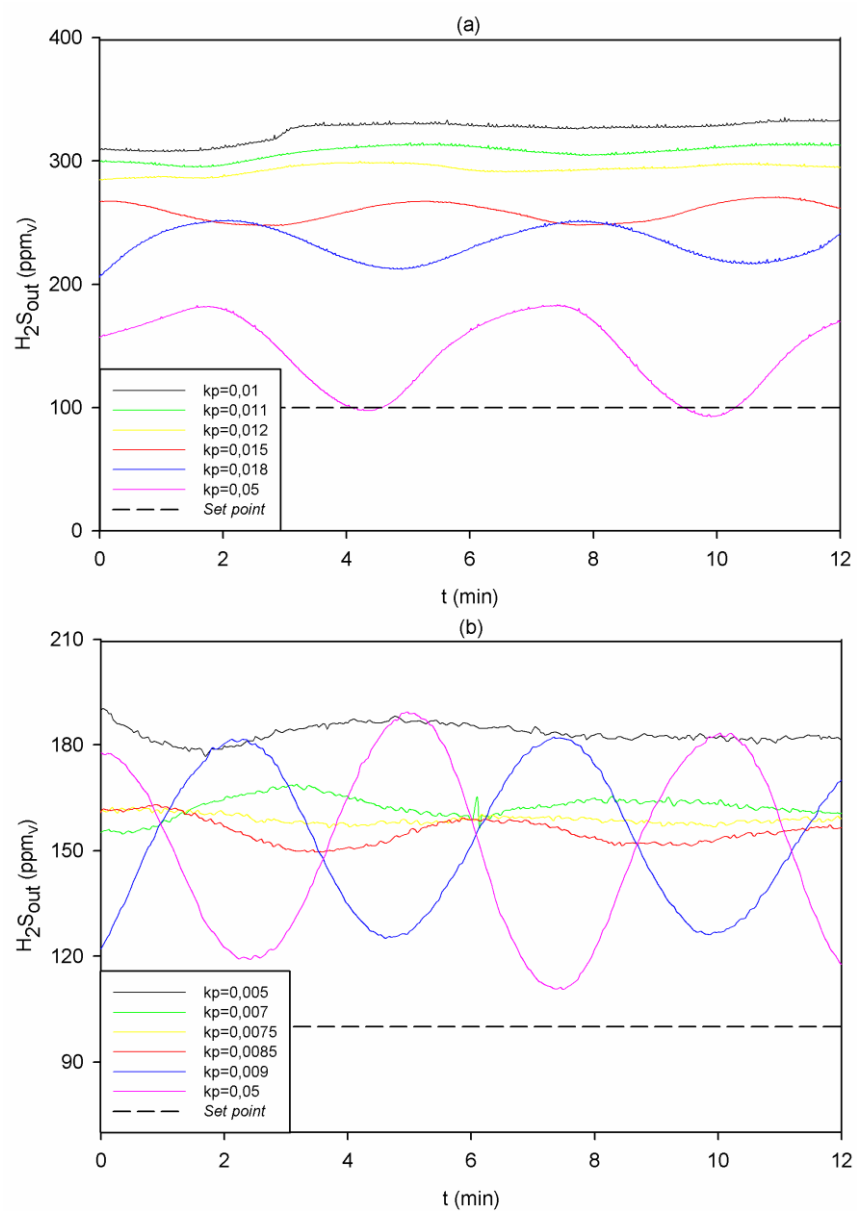


Figura 16. Oscilación mantenida para el sistema operando con nitrato. (a) ajuste del día 177 y (b) ajuste del día 393.

El período de la oscilación mantenida, para el ajuste del día 177 (Fig. 16a) y para el ajuste del día 393 (Fig. 16b) fue similar, aunque se produjo una disminución (56,7%) en el valor de la última ganancia. Lo cual puede indicar un aumento de la sensibilidad del sistema.

Tabla 12 Parámetros para los ajustes por oscilación mantenida.

Ajuste del día	Aceptor de electrones	Rango de ganancia proporcional	K_U	T_U
177	Nitrato	0,01-0,05	0,0150	343,00
393		0,005-0,050	0,0085	348,00
311	Nitrito	0,015-0,050	0,0250	298,14
445		0,07-0,16	0,1400	148,00

Por otro lado, en el ajuste de controladores en la operación con nitrito del día 311 (Fig. 17a), y del día 445 (Fig. 17b), se obtuvieron periodos de oscilación inferiores a los determinados en el ajuste con nitrato, en cambio, las últimas ganancias fueron considerablemente superiores. Un aumento del valor de K_U se traduce en aumentos de las ganancias proporcional, integral y derivativa, lo cual, dependiendo del sistema, puede tener un efecto de retardo sobre el control. Respecto a valores inferiores de T_U , estos producen aumentos en la ganancia integral con un efecto estabilizador sobre las oscilaciones que se produzcan en la respuesta de la variable de control, y a su vez provocan una disminución de la ganancia derivativa pudiendo disminuir la sensibilidad al ruido en la medición de la variable de control. No obstante, estas correlaciones pueden no ser exactas, debido a que las ganancias son dependientes unas de otras y el cambio en una de ellas puede producir cambios en el efecto de las otras dos (Smith y Corripio, 1985).

A partir de los resultados obtenidos en los cuatro ajustes de controladores anteriores y haciendo uso de las ecuaciones incluidas en la tabla 8, se calcularon las constantes de los controladores P, PI y PID (Tabla 13).

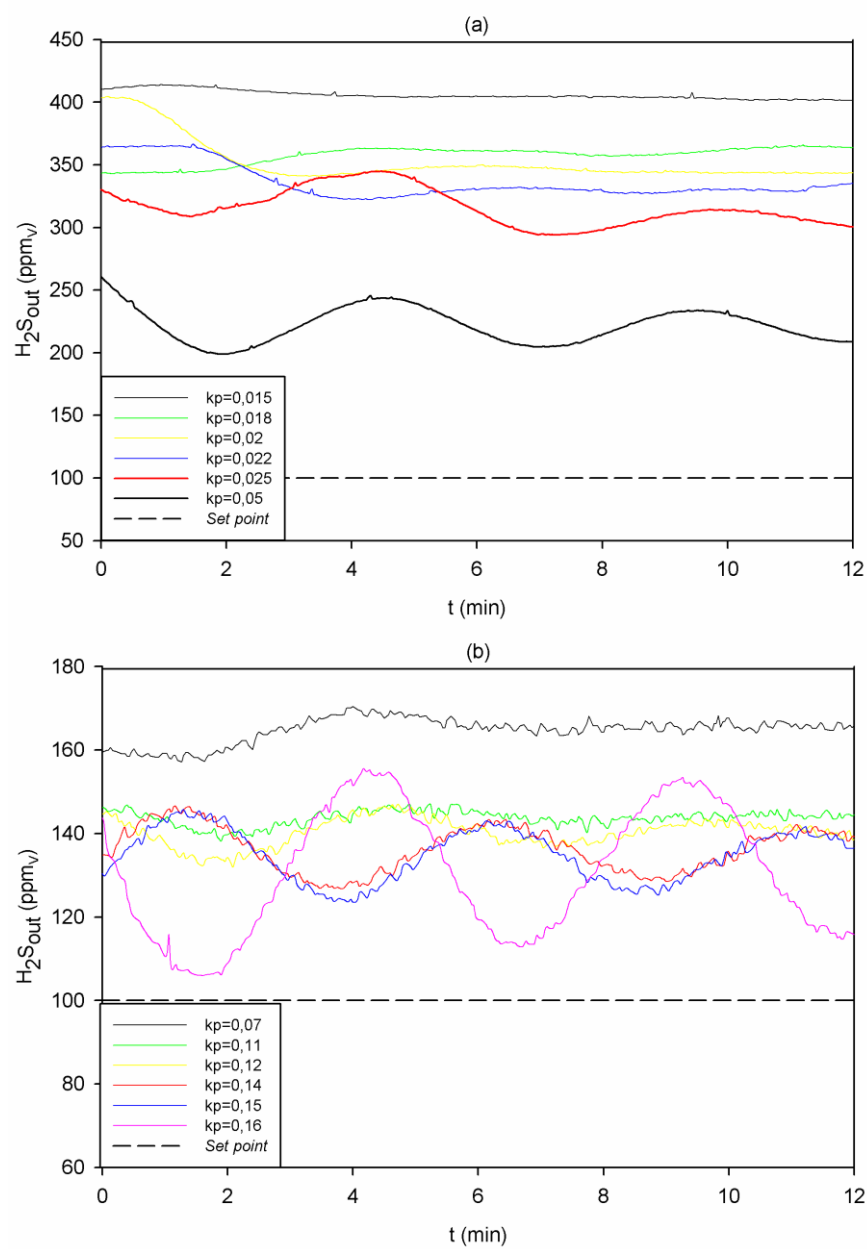


Figura 17. Oscilación mantenida para el sistema operando con nitrito. (a) ajuste del día 311, (b): ajuste del día 445.

Tabla 13 Constante de controladores calculadas a partir de los resultados de la oscilación mantenida.

Operación con nitrato						
Ajuste del día 177			Ajuste del día 393			
	PID	PI	P	PID	PI	P
k_p	$9,00 \times 10^{-3}$	$6,75 \times 10^{-3}$	$7,50 \times 10^{-3}$	$5,10 \times 10^{-2}$	$3,83 \times 10^{-3}$	$4,25 \times 10^{-3}$
k_i	$5,25 \times 10^{-5}$	$2,36 \times 10^{-5}$	-	$2,93 \times 10^{-4}$	$1,29 \times 10^{-5}$	-
k_d	$3,86 \times 10^{-1}$	-	-	$2,22 \times 10^{-1}$	-	-
Operación con nitrito						
Ajuste del día 311			Ajuste del día 445			
	PID	PI	P	PID	PI	P
k_p	$1,50 \times 10^{-2}$	$1,13 \times 10^{-2}$	$1,25 \times 10^{-2}$	$8,40 \times 10^{-2}$	$6,3 \times 10^{-2}$	$7,00 \times 10^{-2}$
k_i	$1,01 \times 10^{-4}$	$4,44 \times 10^{-5}$	-	$1,14 \times 10^{-3}$	$5,11 \times 10^{-4}$	-
k_d	$5,59 \times 10^{-1}$	-	-	1,55	-	-

A pesar de la variación, entre los valores de la última ganancia para cada método de ajuste, (56,7% en la operación con nitrato y 17,9% en la operación con nitrito), esta variación se tradujo en una diferencia de entre 52-69%, en las constantes calculadas de los controladores.

Entre las constantes del ajuste del día 311 y ajuste del día 445 hubo una diferencia de entre un 8,6-35,0%, produciéndose una menor variación entre estos valores que entre los calculados por el ajuste del día 177 y ajuste del día 393. No obstante, es de esperar que dicha variación sea considerada poco influyente en la respuesta del sistema de control, debido a que la variación fue inferior al 50% (Smith y Corripio, 1985), como fue comprobado en los apartados 4.3 y 4.4.2.4.

4.2.2 Lazo abierto. Método del escalón.

El método del escalón, como ha sido explicado anteriormente, solo fue utilizado en los ajustes de los días 177 y 445. La figura 18 muestra el procedimiento gráfico para ambos ajustes cuando el aceptor de electrones

fue nitrato (Fig. 18a), donde la ratio molar N:S cambio de 0,7 a 0,58 mol N-NO₃⁻:mol S⁻¹, mientras que en el ajuste empleando nitrito (Fig. 18b), la ratio N:S cambio de 1,16 a 0,96 mol N-NO₂⁻:mol S⁻¹. En ambos ajustes, la ratio molar N:S cambio del 44% al 36% del valor teórico para la oxidación total a sulfato, según la ecuación 4 para el nitrato y la ecuación 5 para el nitrito. Pese a que esta variación fue igual para ambos ajustes, la concentración de salida de H₂S fue menor en la operación con nitrato (78 ppm_v) que en el ajuste con nitrito (138 ppm_v). Posiblemente debido al corto período de tiempo de operación con nitrito tras finalizar el periodo III, sin que esta variación provocara un cálculo erróneo en las ganancias estimadas para cada controlador. No obstante, debido a la alta concentración de entrada de H₂S después de realizar el escalón (2280 ppm_v), los porcentajes de eliminación fueron similares en ambos ajustes, 96,5% para el nitrato y 94,0% en el caso del nitrito.

Tras representar la concentración de salida de H₂S frente al tiempo, fue posible obtener los parámetros K, T y L mediante las ecuaciones recogidas en la tabla 7 y las ecuaciones 11 y 12. Para estos ajustes realizados se calcularon las ganancias por los métodos de ajuste AMIGO y Ziegler-Nichols (Tabla 14).

La comparación de los resultados que se muestran en la tabla 14, indica que en el ajuste del día 177, para ambos métodos de ajuste, la constante que menor variación presenta es la ganancia proporcional (6-20%), la ganancia integral presentó una variación de entre 56-62%, mientras que, en la ganancia derivativa, los valores difieren un 55%.

Para el ajuste del día 445, la comparación de ambos métodos de ajuste, permitió conocer la diferencia de las constantes que han sido calculadas. La ganancia proporcional fue la que presentó una mayor variación de los datos analizados (27-50%). Por otro lado, la ganancia integral de ambos métodos fue exactamente la misma, mientras que la ganancia derivativa difirió en un 41%.

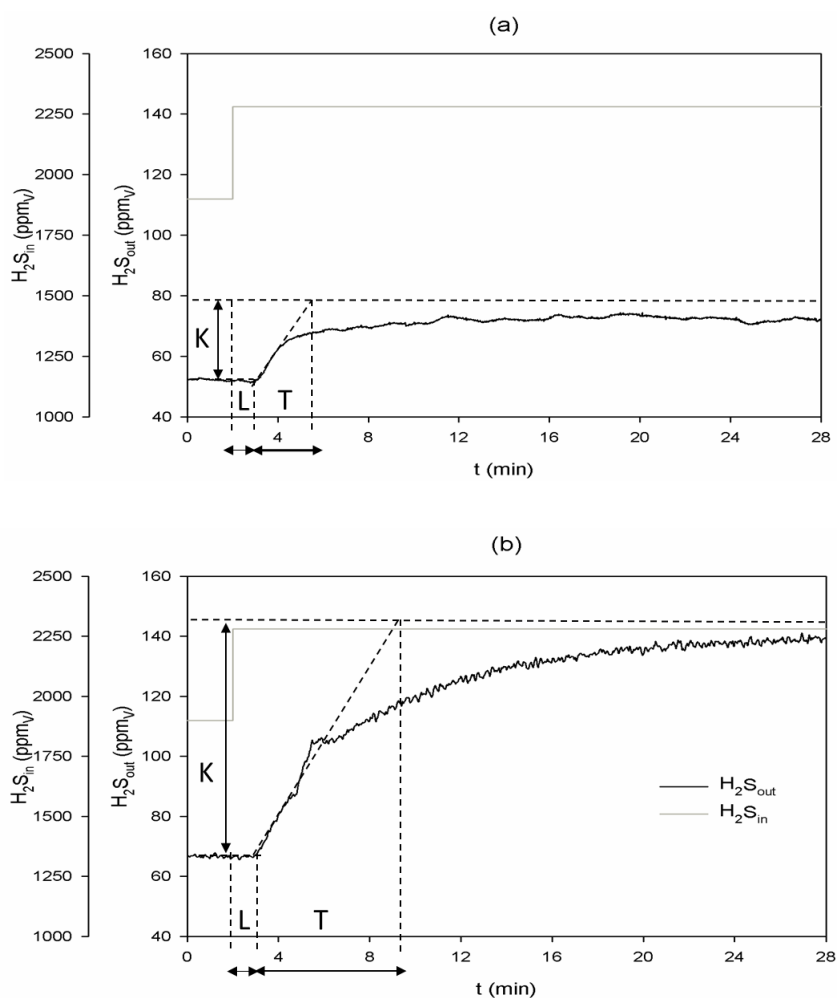


Figura 18. Variación de concentraciones de H_2S a la salida y entrada para el ajuste por el método del escalón. (a) ajuste del día 177 (nitrato), (b) ajuste del día 445 (nitrito).

Si comparamos entre los ajustes de los días 177 y 445, los resultados de cada método presentaron variaciones poco significativas. En los parámetros calculados por Ziegler-Nichols, las ganancias para los controladores PID presentaron una variación de 4-16%, para los valores correspondientes a los controladores PI 8-52% y en el controlador P tan solo un 8%.

Tabla 14 Constantes de los controladores para el ajuste del día 177 y ajuste del día 445.

Ajuste del día 177					
Ganancias	Ziegler-Nichols			AMIGO	
	PID	PI	P	PID	PI
k_p	$7,95 \times 10^{-2}$	$5,96 \times 10^{-2}$	$6,62 \times 10^{-2}$	$3,99 \times 10^{-2}$	$1,66 \times 10^{-2}$
k_i	$5,00 \times 10^{-4}$	$2,00 \times 10^{-5}$	-	$4,00 \times 10^{-4}$	$2,00 \times 10^{-5}$
k_d	3,35	-	-	1,37	-
Ajuste del día 445					
	Ziegler-Nichols			AMIGO	
	PID	PI	P	PID	PI
k_p	$6,23 \times 10^{-3}$	$4,89 \times 10^{-3}$	$5,43 \times 10^{-3}$	$5,21 \times 10^{-3}$	$1,36 \times 10^{-3}$
k_i	$7,75 \times 10^{-5}$	$3,87 \times 10^{-5}$	-	$1,76 \times 10^{-4}$	$1,03 \times 10^{-4}$
k_d	$1,37 \times 10^{-1}$	-	-	$6,21 \times 10^{-2}$	-

Si realizamos la misma comparación, pero teniendo en cuenta los valores obtenidos para AMIGO, encontramos una variación de 4-44% para las constantes de los controladores PID y entre 8-19% en los valores del controlador PI.

A pesar de la variación en los valores calculados de las ganancias, Smith y Corripio (1985) plantean, que variaciones inferiores al 50% en los valores de los parámetros de ajuste de los controladores, rara vez tienen efectos significativos en la respuesta del sistema de control retroalimentado, de ahí que un mismo sistema pueda ser controlado con diferentes juegos de ganancias, lo cual justifica la elección de juegos de ganancias diferentes.

La principal ventaja de las reglas de ajuste, basadas en el método del escalón, radica en que sólo se necesita una única prueba experimental. Sin embargo, tiene algunos inconvenientes (Ogata, 2010):

- Es llevado a cabo en condiciones de lazo abierto, lo que implica que, si se produce una perturbación significativa durante la prueba, no se llevará a cabo ninguna acción correctiva. En consecuencia, el proceso puede ser alterado y los resultados de la prueba pueden ser engañosos.
- El método no es aplicable a los procesos de lazo abierto inestables.

- Para los controladores en operación continua, el método tiende a ser sensible a los errores que cometan en la calibración controlador.

4.2.3 Criterios de selección de controladores.

Los criterios de selección, que a continuación serán analizados, fueron empleados para los controladores ajustados por el ajuste de los días 177 y 445.

Para analizar el efecto de la acción de control sobre el sistema, se realizó la misma perturbación realizada sobre el sistema sin acción de control (lazo abierto) (Fig. 19). De esta forma, para la selección del controlador a partir de los resultados del ajuste del día 177, se tuvo en cuenta la respuesta de la variable de control (Fig. 20-22) ante un cambio de tipo escalón en las mismas condiciones descritas en el apartado 3.5.2 para cada uno de los controladores ajustados.

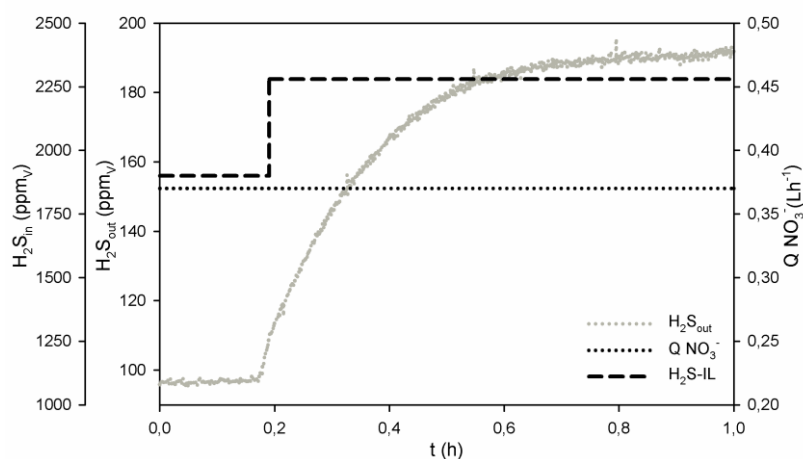


Figura 19. Ajuste del día 144. Sistema sin control.

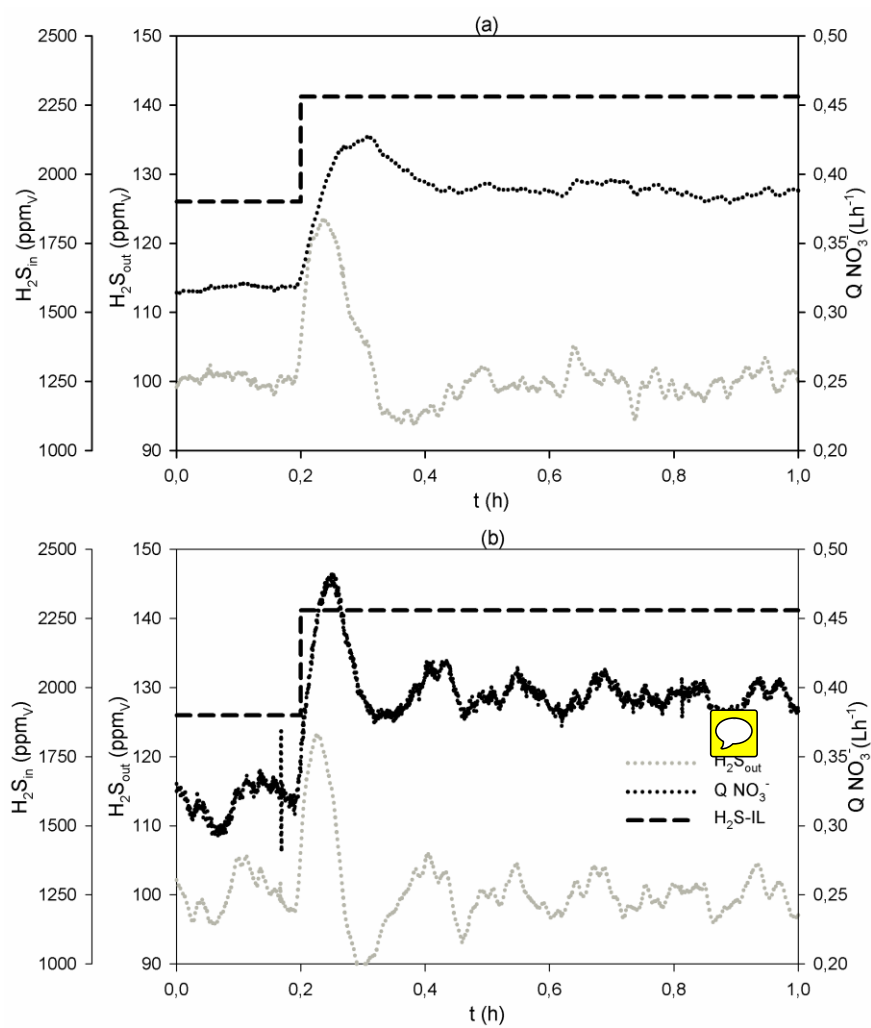


Figura 20. Ajuste del día 144 por AMIGO. (a) controlador PID, (b) controlador PI.

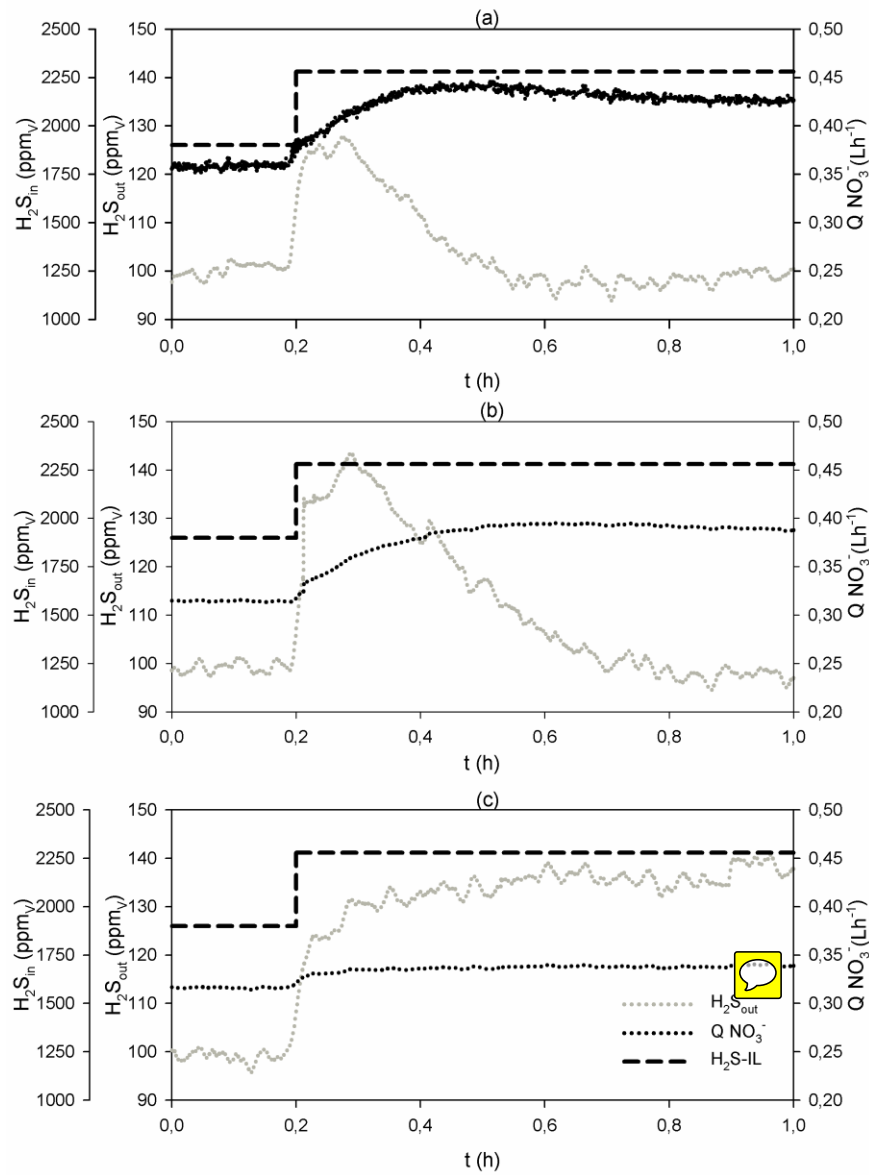


Figura 21. Ajuste del día 144 por OM. (a) controlador PID, (b) controlador PI, (c) controlador P.

El resultado del ajuste realizado por el método del escalón utilizando Ziegler-Nichols es mostrado en la figura 22. Mediante estos controladores no fue posible controlar adecuadamente el sistema y se produjo una oscilación continua de la variable manipulada, así como una gran amplitud de oscilación en la variable de control. Estas variaciones fueron, en el caso del controlador PID (Fig. 22a) de 14,40-174,80 ppm_v y 0,06-0,92 L h⁻¹, para la concentración de salida de H₂S y caudal de alimentación, respectivamente, lo cual pudo deberse al alto valor de la ganancia derivativa (3,35) unido al ruido en la medición de la variable de control. Mientras que, para el controlador PI (Fig. 22b), la concentración de salida de H₂S varió en el rango de 19,27-175,85 ppm_v, y el caudal de nitrato osciló entre 0,06-0,62 L h⁻¹. Por último, en el caso del controlador P (Fig. 22c), las variaciones registradas fueron de 112,82-242,98 ppm_v y 0,06-0,63 L h⁻¹. En el ajuste de estos dos controladores, la ganancia proporcional fue mayor que los valores obtenidos por oscilación mantenida y AMIGO, y puede ser este hecho el responsable de la inestabilidad del sistema.

Los parámetros obtenidos por el ajuste de Ziegler-Nichols (escalón), han provocado mayor sensibilidad, convirtiendo el sistema en inestable. Por tanto, solo los controladores ajustados por la oscilación mantenida y AMIGO tuvieron una acción control del sistema satisfactoria.

Aplicando las ecuaciones 13, 14 y 15, para este mismo ajuste, se realizó el cálculo de los criterios basados en el tiempo integral (Tabla 15), para un tiempo de 60 min, en el que se alcanzó el estado estacionario para la respuesta de todos los controladores. Los valores muestran que, en la respuesta de los controladores ajustados por AMIGO, se obtuvieron los errores más bajos.

A pesar de que el error calculado, en la respuesta de los controladores ajustados por oscilación mantenida fue casi diez veces mayor para el controlador PID, y tres veces mayor para el controlador PI, el registro de las variables de control y manipulada, presentó un comportamiento mucho más suavizado (Fig. 21a-b), si es comparado con la persistente oscilación de ambas variables en los controladores ajustados por AMIGO (Fig. 20). Hemos considerado que es importante evitar este comportamiento, pues su tendencia a incrementarse en el tiempo, unido a la sensibilidad del sensor de H₂S, podría arrastrar al sistema hacia un estado de no control, hecho que se constató en el apartado 4.4.2.5.

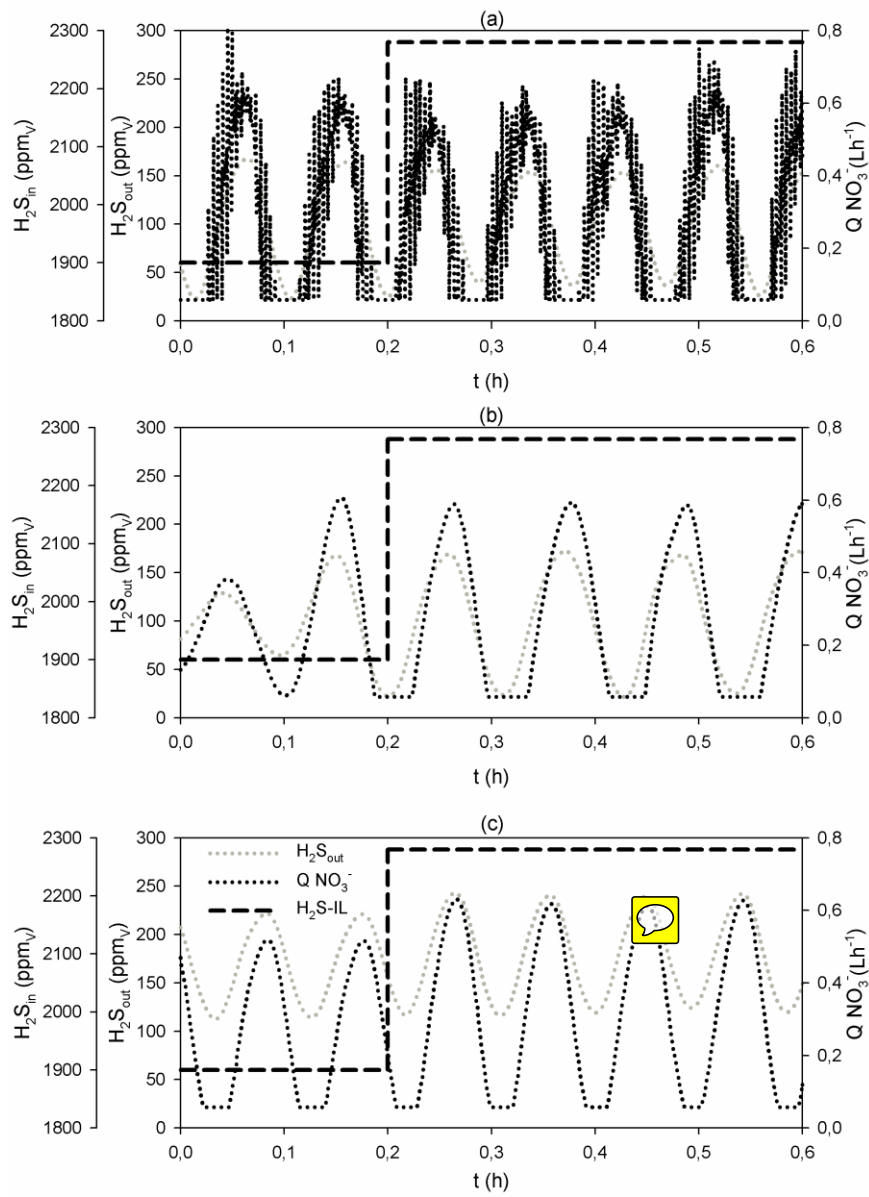


Figura 22. Ajuste del día 144 por Ziegler-Nichols. (a) controlador PID, (b) controlador PI, (c) controlador P.

Tabla 15 Criterios de errores calculados a partir del ajuste del día 177.

	OM		AMIGO	
	PID	PI	PID	PI
ISE	306,0	99,0	34,0	30,0
IAE	11,3	5,9	3,1	3,4
ITAE	4,0	2,0	1,0	1,0

Por otro lado, la tabla 16 muestra los parámetros calculados a partir de la respuesta de la variable de control. Estos han sido calculados para los controladores que mostraron controlabilidad en el sistema, entendiéndose esta propiedad como la capacidad de control de un sistema, que a partir de una acción es capaz de gobernar el proceso desde un estado inicial arbitrario a un estado final arbitrario, dentro de un horizonte de tiempo finito (Lipták, 2006).

Estos parámetros fueron: *offset*, tiempo de estabilización (tiempo que tarda el sistema en alcanzar el valor del *set point*), concentración de salida de H₂S promedio y la oscilación en la variable de control (máximo y mínimo valor una vez que se alcanza el valor del *set point*).

Tabla 16 Parámetros para selección de controladores.

	OM			AMIGO	
	PID	PI	P	PID	PI
<i>Offset</i> (ppm _v)	5,55	4,40	42,34	7,12	5,35
Tiempo de estabilización (h)	0,41	0,72	0,36	0,25	0,29
Valor medio H ₂ S _{out} (ppm _v)	98,90	98,30	137,10	100,00	99,80
Oscilación H ₂ S _{out} (ppm _v)	93,80-104,40	94,50-102,70	131,90-142,30	93,70-107,10	94,50-105,20

La mayoría de los controladores presentaron valores de *offset* muy pequeños (inferiores a 7,12 ppm_v), excepto el controlador de tipo P (Fig.

21c). A pesar de que el ajuste de este tipo de controladores tiene como principal ventaja el hecho de que solo es necesario determinar una ganancia (k_p), el valor de *offset* alcanzado fue de 42,34 ppm_v. Como consecuencia de estos altos valores de *offset*, este tipo de controlador es frecuentemente descartado en aplicaciones industriales (Pramod y Chidambaram, 2000). Por lo que fue excluido del proceso de selección.

Entre los otros cuatro controladores (PI y PID) los ajustados por la oscilación mantenida, presentaron los menores valores de *offset* de su clase. Todos ellos fueron capaces de mantener el valor de la variable de control muy cercano al *set point*. Para estos cuatro controladores, el valor medio de la concentración de salida de H₂S, varió desde 98,3 ppm_v (PI-OM Fig. 21b) hasta 100 ppm_v (PID-AMIGO).

Respecto al tiempo de estabilización, el máximo valor (0,72 h) correspondió al controlador PI-OM, mientras que los controladores PID-AMIGO (Fig. 20a) y PI-AMIGO (Fig. 20b) estabilizaron la variable de control a 0,25 h y 0,29 h, respectivamente. Aunque la respuesta de la variable de control con el controlador PID ajustado por AMIGO se estabilizó en menos tiempo (0,25 h) respecto al PID-OM (0,41 h). En este último controlador apenas se produjeron oscilaciones, incluso también fue observado un comportamiento similar en la variable manipulada. El controlador PID-OM fue seleccionado para llevar a cabo la experimentación descrita en el apartado 3.4.1. En dicha selección primó el criterio de ser el controlador con menor *offset* y presentar un ajuste suavizado en la variable de control, frente al criterio basado en los errores calculados.

Tras realizar el ajuste de controladores del día 445, se descartó calcular las ganancias de los controladores tipo P. Seguidamente se realizó un cambio de tipo escalón (Fig. 23) para los restantes controladores del tipo PI y PID, según condiciones descritas en el apartado 3.5.2.

De igual manera, considerando la respuesta de la variable de control para cada uno de los controladores ajustados (Fig. 23a), fueron calculados los criterios de error integral más utilizados (IAE, ISE, ITAE). Para lo cual se consideró un tiempo de 60 min, para lograr el estado estacionario del sistema bajo la acción de cada uno de los controladores, después de haberse realizado la perturbación.

A partir de las ecuaciones descritas en los apartados 3.3.3.1, estos criterios fueron calculados y los resultados se muestran en la tabla 17.

Tabla 17 Errores calculados a partir del ajuste del día 445.

	OM		AMIGO		Ziegler-Nichols	
	PID	PI	PID	PI	PID	PI
ISE	28,0	32,1	110,7	255,5	233,1	559,5
IAE	3,2	2,7	6,8	10,4	9,9	16,0
ITAE	58,5	45,8	118,5	117,8	170,9	274,3

La comparación de los resultados anteriores, indica que existe una reducción significativa entre los errores calculados para los controladores ajustados por OM, tanto PI como PID, respecto los otros dos métodos de ajuste. Específicamente, el error ISE fue entre un 75-95% inferior comparado con los controladores PI y PID ajustados por AMIGO y Ziegler-Nichols. De igual manera el error IAE se redujo entre un 53-83% en los controladores ajustados por OM, así como el error ITAE, donde la reducción fue de 51-83% en ambos controladores.

De manera general, los controladores ajustados en la operación con nitrito y los métodos de OM y AMIGO (Tabla17) presentaron mayores valores de errores basados en tiempo integral, que los ajustados en la operación con nitrato (Tabla 15). La causa de este comportamiento puede estar en un aumento de la sensibilidad en la operación con nitrito, que previamente ha sido observada en la estimación de los parámetros K_U y T_U por OM.

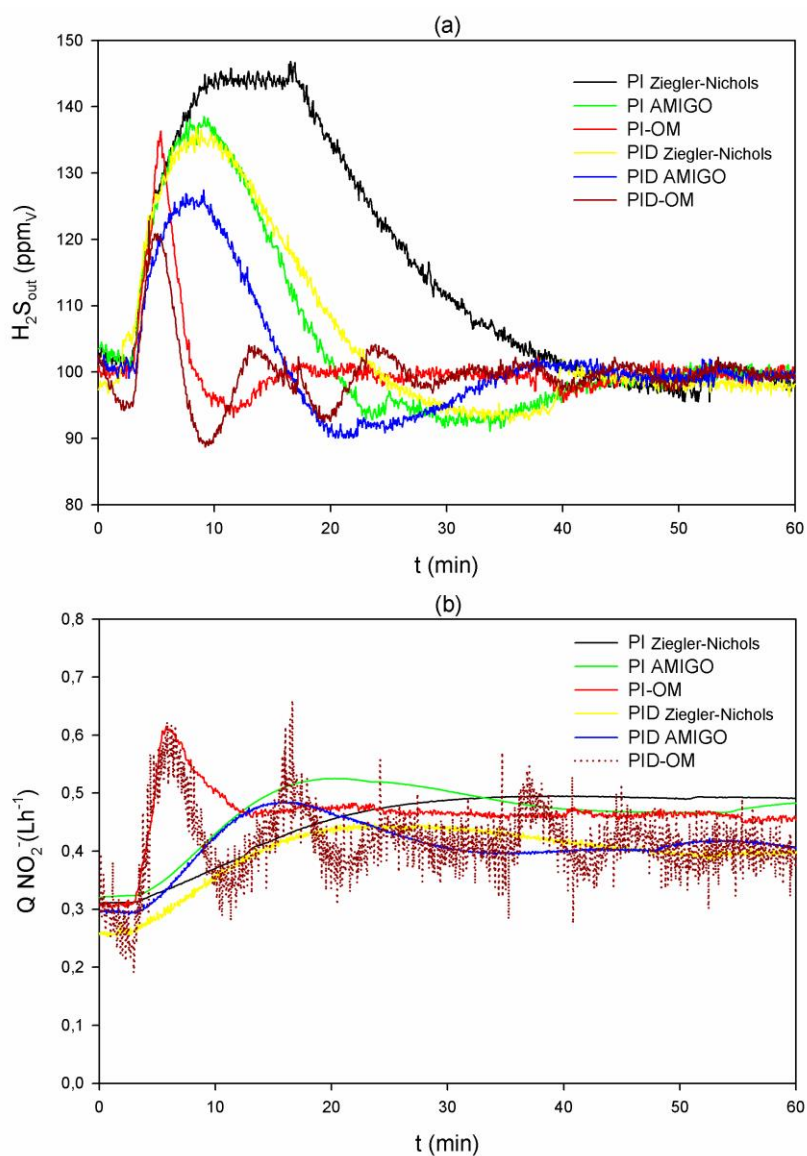


Figura 23. Perturbación en escalón para controladores del ajuste del día 445. (a) concentración de salida de H_2S , (b) caudal de nitrito.

Por otro lado, la figura 23b muestra el comportamiento del caudal de nitrito, para cada uno de los controladores. Es importante señalar la

variación que presentó la variable manipulada del controlador PID-OM, respecto a los demás controladores, que fue mucho más oscilante. Es de esperar que, si dicho comportamiento se mantiene o incrementa en el tiempo, provoque inestabilidad en el sistema de control.

Además de los criterios del tiempo integral, se procedió a calcular, de igual forma que para la selección del controlador del ajuste del día 177, algunas características que se utilizan para evaluar la respuesta dinámica del sistema (Tabla 18).

Tabla 18 Características de la respuesta ante entrada en escalón para los controladores ajustados por ajuste del día 445.

		OM		AMIGO		Ziegler-Nichols	
		PID	PI	PID	PI	PID	PI
<i>Offset</i> (ppm _v)		2,73	4,03	2,16	2,17	3,05	3,65
Tiempo de estabilización (h)		0,46	0,28	0,65	0,73	0,66	0,84
Valor medio H ₂ S _{out} (ppm _v)		99,6	99,5	99,9	99,7	98,9	99,2
Oscilación H ₂ S _{out} (ppm _v)		96,8-101,5	95,4-102,3	97,7-102,1	97,5-101,5	96,9-102,0	95,5-101,8

Los valores de *offset* fueron similares para los controladores ajustados, así como el valor medio de la variable de control y la oscilación de la misma.

Basados en los criterios de error integral, fueron seleccionados los controladores con los menores valores, siendo el PID y PI ajustados por el método de la oscilación mantenida. De igual forma coincidió en que estos controladores fueron los que presentaron el menor tiempo de estabilización, 0,46 h para el PID y 0,28 h para el PI.

4.3 Cambios del aceptor de electrones.

Los tres cambios progresivos del aceptor electrones fueron llevados a cabo en el BTF bajo la acción del controlador PID, correspondiente al trabajo experimental previo a cada cambio y para un *set point* de 100 ppm_v. Las ganancias de estos controladores PID fueron obtenidas por el ajuste con oscilación mantenida, y dichos valores se muestran en la tabla 19. Una vez finalizado cada periodo se llevó a cabo un nuevo ajuste de controladores, para realizar los posteriores trabajos experimentales con cada aceptor de electrones.

Tabla 19 Constantes de los controladores PID empleados en los cambios del aceptor de electrones.

	k_p	k_i	k_d
PID Periodo I	$9,00 \times 10^{-3}$	$5,24 \times 10^{-5}$	$3,86 \times 10^{-1}$
PID Periodo II	$1,5 \times 10^{-2}$	$1,01 \times 10^{-4}$	$5,6 \times 10^{-1}$
PID Periodo III	$5,1 \times 10^{-3}$	$2,93 \times 10^{-5}$	$2,22 \times 10^{-1}$

Los valores de las ganancias obtenidas para el controlador empleado en el periodo I fueron entre 1,74 y 1,78 veces superiores a los valores calculados en el periodo III, ambos de nitrato a nitrito, sin embargo, las constantes del controlador empleado en el periodo II, fueron entre 1,45 y 1,92 veces mayor que las constantes del periodo I y superó a los valores del periodo III entre 2,5 y 3,4 veces.

Este hecho indica que, en el sistema estudiado, el cambio de nitrito a nitrato, produjo durante los ajustes de los controladores, variaciones significativas en los valores de las ganancias del controlador PID empleado. No obstante, los cambios progresivos del aceptor de electrones, no se tradujeron en inestabilidades del sistema (Tabla 20).

En consecuencia, con lo anteriormente expuesto, apenas se produjo desviación del *set point* de la variable controlada, en el transcurso de cada cambio del aceptor de electrones. El *offset* para dicho parámetro fue inferior a 4,14 ppm_v durante el periodo I y alcanzó valores inferiores a 0,54 ppm_v y 1,20 ppm_v durante el periodo II y III, respectivamente,

manteniéndose el porcentaje de eliminación para las condiciones de operación controlada. Lo cual evidenció que los cambios que se produjeron durante los cambios del aceptor de electrones, fueron tolerados y no tuvieron una repercusión negativa en la acción de control del sistema. Además, no fue detectada acumulación de nitrato y nitrito en el sistema, durante los cambios llevados a cabo. Con excepción de los primeros cinco días del periodo I, donde la concentración de nitrito no superó los $0,7 \text{ mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$, el resto del período de investigación apenas fue detectada la presencia de estos aniones (nitrato-nitrito) a la salida del BTF.

Tabla 20 Resultados experimentales para los cambios del aceptor de electrones con controladores PID.

	H₂S_{out} (ppm_v)	RE (%)	Ratio N:S_{in} (mol-N mol-S⁻¹)
Periodo I	99,9±2	94,74±0,01	0,88-1,54
Periodo II	100,1±1	94,73±0,02	0,45-0,85
Periodo III	99,9±2	94,74±0,02	0,45-1,25

Cabe resaltar la alta eliminación de H₂S que se mantuvo durante los tres períodos de cambio del aceptor de electrones. Dicho aspecto es muy relevante desde el punto de la aplicación industrial por la reducción de costes económicos si tenemos en cuenta que no es necesaria una oxidación completa a nitrato para llevar a cabo el proceso de desulfuración y, por ende, suministrar menos aire en el proceso de nitrificación (Peng *et al.*, 2004). De forma que, una corriente líquida que contenga una mezcla de los aceptores de electrones aquí empleados (nitrato-nitrito), o sistemas que conlleven a una acumulación de nitrito (Ruiz *et al.*, 2006), podrían ser empleados sin tener una influencia negativa en la eficiencia de un BTF anóxico. Y la viabilidad de un sistema biológico de producción de nitrato, a partir de aguas ricas en amonio, para la desulfuración de biogás, ha sido exitosamente llevada a cabo a escala de laboratorio con efluentes sintéticos (Cano *et al.*, 2016a).

Por otro lado, los datos del porcentaje de eliminación y la ratio N:S_{in}, se corresponden con los valores obtenidos por Baspinar *et al.* (2011) en el estudio de la biodesulfuración de biogás procedente de un digestor anaerobio. Estos autores emplearon agua residual con nitrato y nitrito como

aceptores de electrones en un biolavador con cargas de entrada de H_2S entre $83,3\text{-}166,6 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. En este estudio, el porcentaje de eliminación de H_2S se mantuvo en valores superiores al 90% para ratios N:S_{in} entre $2,0\text{-}1,0 \text{ mol-N mol-S}^{-1}$. Consecuentemente, al disminuir la ratio N:S_{in} ($1,00\text{-}0,34 \text{ mol-N mol-S}^{-1}$), el porcentaje de eliminación disminuyó. Esta cuestión resulta muy interesante, ya que a pesar de que se proporcionó suficiente cantidad de nitrógeno, para estequiométricamente realizar la oxidación parcial del sulfuro (Ec. 3 y 6), esta cantidad de aceptor de electrones no fue utilizada por el sistema, para la eliminación total del H_2S del biogás.

De igual forma, según los resultados que se muestran en la tabla 20, la ratio N:S_{in} fue superior al requerimiento estequiométrico para la oxidación parcial del sulfuro durante los tres periodos de cambios del aceptor de electrones.

La figura 24, muestra la relación entre el sulfato producido y la ratio $\text{N:S}_{\text{eliminado}}$ para los tres cambios de aceptor de electrones. Estos resultados se encontraron entre los valores teóricos descritos para la oxidación de sulfuro con nitrito (Mahmood *et al.*, 2007) y con nitrato (Soreanu *et al.*, 2008a).

Al término del periodo I (Fig. 25a), la ratio del sistema aumento un 39% desde $1,03 \text{ mol N-NO}_3^- \text{ mol-S}_{\text{eliminado}}^{-1}$ a $1,43 \text{ mol N-NO}_2^- \text{ mol-S}_{\text{eliminado}}^{-1}$. La selectividad a sulfato se mantuvo aproximadamente constante $0,22 \pm 0,03 \text{ gS-SO}_4^{2-} (\text{gS-H}_2\text{S}_{\text{eliminado}})^{-1}$ durante los primeros 11 días de cambio, aumentando a partir del día 12 hasta el final de dicho cambio desde 0,32 a $0,52 \text{ gS-SO}_4^{2-} (\text{gS-H}_2\text{S}_{\text{eliminado}})^{-1}$. Siendo el azufre elemental el principal producto de oxidación, acorde con los valores reflejados en la tabla 21 y con los anteriormente analizados por Baspinar *et al.* (2011).

Tras 68 días de operación ininterrumpida con nitrito, y comenzando el periodo II (Fig. 25b), es posible que se haya producido una mayor adaptación de la biomasa y un mejor aprovechamiento del N-NO_2 . Durante este periodo, la ratio $\text{N:S}_{\text{eliminado}}$ pasó de $0,69 \text{ mol N-NO}_2^- \text{ mol S}_{\text{eliminado}}^{-1}$, a $0,52 \text{ mol N-NO}_3^- \text{ mol S}_{\text{eliminado}}^{-1}$. Mientras que la selectividad de sulfato estuvo entre $0,18\text{-}0,31 \text{ gS-SO}_4^{2-} (\text{gS-H}_2\text{S}_{\text{eliminado}})^{-1}$, siendo la oxidación parcial de sulfuro predominante, mostrando la coherencia entre los valores de la ratio N:S , calculados y mostrados en la tabla 21.

Al inicio del periodo III (Fig. 25c), la ratio aumentó hasta $0,84 \text{ mol N-NO}_3^- \text{ mol S}_{\text{eliminado}}^{-1}$, aunque es un valor inferior si se compara con la que operaba el BTf en el momento de inicio del periodo I ($1,03 \text{ mol N-NO}_3^- \text{ mol S}_{\text{eliminado}}^{-1}$).

Durante la última etapa de cambio del aceptor de electrones, la ratio aumentó hasta $1,32 \text{ mol N-NO}_2^- \text{ mol S}_{\text{eliminado}}^{-1}$. Mientras que la selectividad a sulfato se mantuvo prácticamente constante ($0,23 \pm 0,06 \text{ gS-SO}_4^{2-} (\text{gS-H}_2\text{S}_{\text{eliminado}}^{-1})$), valor similar al que fue estimado durante los primeros 11 días del periodo I.

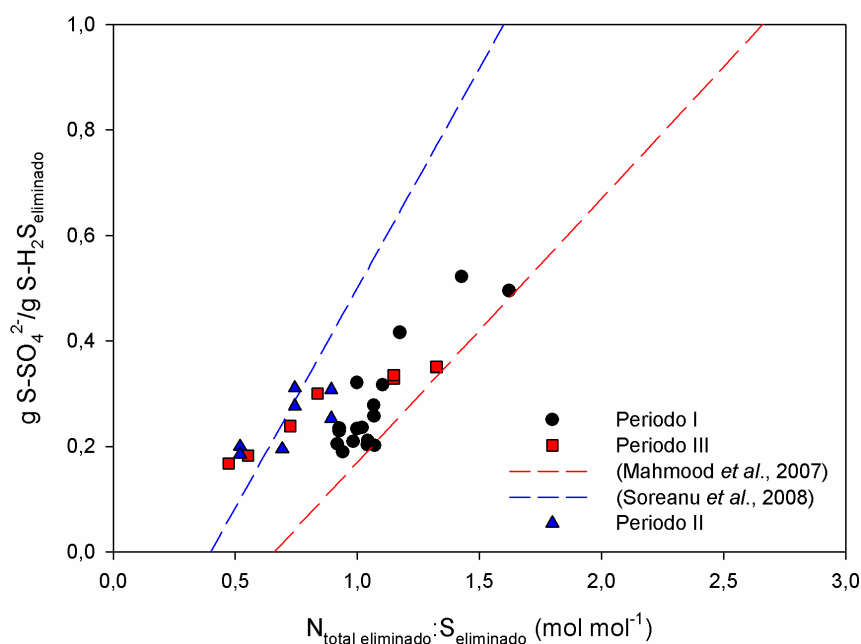


Figura 24. Selectividad de sulfato en función de la ratio $\text{N:S}_{\text{eliminado}}$ durante los tres cambios del aceptor de electrones.

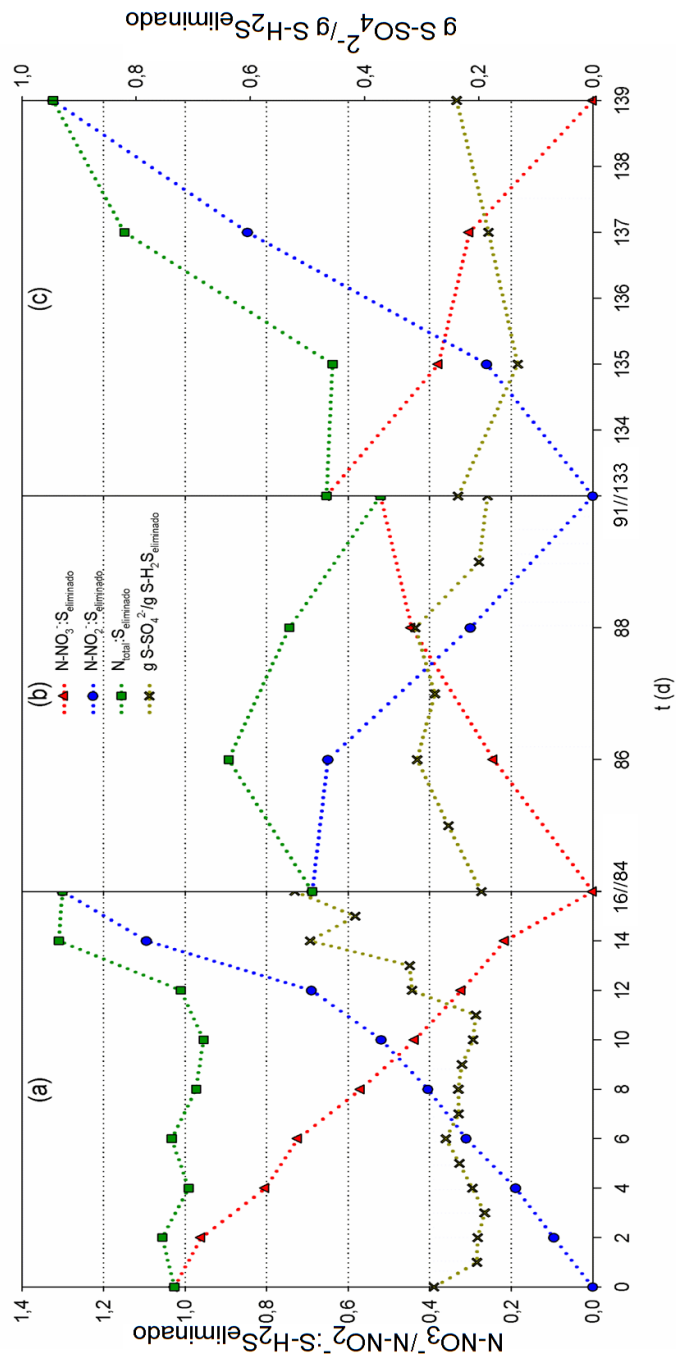


Figura 25. Comportamiento de la ratio $N:S_{\text{eliminado}}$, durante los tres cambios del aceptor de electrones. (a) periodo I, (b) periodo II, (c) periodo (III).

La Tabla 21 muestra las ratios molares teóricas calculadas, teniendo en cuenta las ecuaciones estequiométricas (Ec.3-4, Ec.5-6). Siendo los moles de electrón por mol de sulfuro de 2 y 8, para la oxidación parcial a azufre elemental o total a sulfato, respectivamente (Ec.3.1-4.2, Ec.5.1-6.2).

Tabla 21 Ratios molares teóricas para la operación con nitrato y nitrito.

Producto final	S ⁰	SO ₄ ²⁻
$\frac{N - NO_3^-}{S}$	0,40	1,60
$\frac{N - NO_2^-}{S}$	0,66	2,66

La ratio N:S_{eliminado} en cada periodo de cambio de aceptor de electrones estuvo entre los valores teóricos estequiométricos. Los resultados de la selectividad de sulfato indican que estuvo favorecida en todos los periodos, la oxidación parcial a azufre elemental y posiblemente otros compuestos intermedios (Amend *et al.*, 2004), tales como polisulfuros, tiosulfato o sulfitos, pero el análisis de los mismos no fue llevado a cabo.

Se constató, de manera directa, la formación de azufre elemental por los resultados de los balances de azufre realizados, también de forma visual, e indirectamente, por la tendencia a incrementarse el pH del medio de recirculación (Lohwacharin y Annachhatre, 2010). Todo ello debido fundamentalmente, a que la ratio total N:S_{eliminado} estuvo durante los tres periodos, entre los valores que estequiométricamente hacen posible la oxidación parcial de sulfuro (Tabla 21).

El análisis de la concentración de nitrato y nitrito de entrada y salida al sistema, permitió determinar la forma en que ambas especies fueron asimiladas. Durante los tres cambios de aceptor de electrones, el consumo máximo de nitrito fue superior al de nitrato. Específicamente en el periodo I, el consumo fue de $6,7 \times 10^{-3} \text{ mmol h}^{-1}$ para el nitrato y $9,5 \times 10^{-3} \text{ mmol h}^{-1}$ para el nitrito. Tras la operación con nitrito, una mejor adaptación de la biomasa podría ser responsable de que durante el periodo II, estos valores

fueron de $3,5 \times 10^{-3} \text{ mmol h}^{-1}$ para el nitrato y $4,6 \times 10^{-3} \text{ mmol h}^{-1}$ para el nitrito. Finalmente, durante el tercer cambio del aceptor de electrones, el máximo consumo de nitrato ($5,6 \times 10^{-3} \text{ mmol h}^{-1}$), tuvo un valor similar al alcanzado en el periodo I, y de manera similar sucedió para el consumo de nitrito ($8,8 \times 10^{-3} \text{ mmol h}^{-1}$). Los resultados anteriores, pueden sugerir una mayor adaptación de la biomasa al concluir el periodo I, con un mejor aprovechamiento del N-NO_2^- . Mientras que el análisis de los periodos I y III, pueden indicar el grado de adaptación y reversibilidad del sistema después de retornar a condiciones similares de las que se partió al iniciar el periodo I.

La relación entre las ratios de eliminación de nitrato y nitrito para los periodos II y III, estuvo en sintonía con los resultados alcanzados por Baspinar *et al.* (2011). Donde la ratio de eliminación de nitrito (hasta un 98%) fue superior a la de nitrato (hasta un 63%), lo cual fue interpretado como un indicio de que existió una preferencia al uso del nitrito como aceptor de electrones para la oxidación de sulfuro. Un comportamiento similar fue demostrado por Jing *et al.* (2010), quienes, tras comparar diferentes aceptores de electrones nitrogenados y una carga de entrada de 450 mgS L^{-1} , encontraron que la velocidad de consumo del reactor UASB que empleo nitrito alcanzo su mayor valor en $0,65 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, mientras que el reactor que utilizo nitrato el consumo estuvo en torno a $0,5 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Estos resultados fueron similares a los del estudio de Mahmood *et al.* (2007), quienes, tras alcanzarse el estado estacionario en el proceso de desnitrificación de dos reactores UASB, determinaron una mayor velocidad de consumo en el reactor que usaba nitrito ($16,31 \text{ kgN-NO}_2^- \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$), que en el reactor que empleó nitrato ($1,73 \text{ kgN-NO}_3^- \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$).

Previo a los periodos I y III se operó con nitrato, el tiempo de operación del BTF a esas condiciones fue de 285 días y 43 días, respectivamente. Pese a la diferencia en los tiempos de operación estable del BTF y a los cambios en la estructura de las poblaciones constatados en el apartado 4.6, se mantuvo una alta tasa de conversión de sustrato.

El cambio más importante, llevado a cabo en el sistema y que tendría mayor influencia en los procesos de aclimatación de las poblaciones microbianas, fue el relativo al aceptor de electrones. El estudio más cercano a esta temática quizás se encuentre en el trabajo de Moraes *et al.* (2012) que encontraron que un cultivo mixto de SOB para una ratio N:S

molar menor de $2,7 \text{ mol-N mol-S}^{-1}$, necesitó más tiempo de adaptación para el uso de nitrato, de la forma eficiente que previamente había empleado el nitrito. Específicamente en la desnitrificación de este sistema, tras cuatro días de operación, se observó la eliminación de casi la totalidad del nitrito presente, mientras que un consumo significativo de nitrato solo fue detectado a partir del décimo día de operación. Además, de la oxidación completa de sulfuro en dos etapas, con el azufre elemental como producto intermedio, fue más evidente cuando fue utilizado el nitrato.

La resiliencia del sistema pudo ser observada en el análisis de los periodos de cambio de aceptor de electrones. Durante los cambios de nitrato a nitrito, el sistema presentó un comportamiento similar. Mientras que en el periodo II, se produjo una mejor utilización del N-NO_2^- .

4.4 Estrategias de control analizadas.

A continuación, se discuten los resultados obtenidos en el estudio de las estrategias de control anticipado y retroalimentado previamente consideradas en este trabajo. Realizando variaciones en la concentración de entrada de H_2S en forma de escalera, pico y escalón, cambio en el *set point* de la variable de control y según la función de escalera sinusoidal. Un aspecto común para todos los experimentos realizados con y sin control realizados fue que la concentración del aceptor de electrones en la purga de la fase líquida fue nula, por lo que la única diferencia se observó en la fase gas.

4.4.1 Control anticipado.

Para el estudio de esta estrategia de control, fue empleada la variación del perfil de carga de entrada de H_2S en forma de escalera, descrita en el apartado 3.5 (Fig. 9a). La tabla 22, presenta los resultados de

la selectividad de sulfato para los experimentos, con y sin control, en la operación con nitrato y nitrito como aceptores de electrones, para la estrategia de control anticipado (días: 171-176, 497-503), donde fue realizada una variación de la carga de entrada de H_2S .

Tabla 22 Selectividad de sulfato para los experimentos con control anticipado y sin control, empleando nitrato y nitrito como aceptores de electrones.

$\text{BTF-NO}_3^- \% \text{SO}_4^{2-}$ ($\text{gS} - \text{SO}_4^{2-} (\text{gS-H}_2\text{S}_{\text{eliminado}})^{-1}$)		$\text{BTF-NO}_2^- \% \text{SO}_4^{2-}$ ($\text{gS} - \text{SO}_4^{2-} (\text{gS-H}_2\text{S}_{\text{eliminado}})^{-1}$)	
No Control	Control	No Control	Control
38±20	33±1	26±14	22±1

Para el experimento sin control con nitrato, el azufre elemental fue el principal producto de oxidación, siendo la selectividad a sulfato inferior al 45% para cargas de entrada mayores de $49,2 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, principalmente por la disminución de la ratio $\text{N:S}_{\text{eliminado}}$ ($0,956$ a $0,358 \text{ mol-N-NO}_3^- \text{ mol-S}^{-1}$). Sin embargo, para las ratios estudiadas entre los valores de carga de entrada $28,1$ - $42,2 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, la selectividad de sulfato fue de entre 53-77% debido al incremento en la ratio $\text{N:S}_{\text{eliminado}}$ ($1,11$ - $1,62 \text{ mol-N-NO}_3^- \text{ mol-S}^{-1}$).

La selectividad al sulfato alcanzada en este estudio sigue la misma tendencia que en los estudios realizados previamente en otros BTF anóxicos, tanto a escala piloto (Almenglo *et al.*, 2016) como a escala de laboratorio (Fernández *et al.*, 2014) (Fig. 26). Una selectividad de sulfato entre 8-95% fue estimada por Almenglo *et al.* (2016), para una ratio N:S entre $0,34$ - $1,74 \text{ mol-N-NO}_3^- \text{ mol-S}^{-1}$. Así mismo Fernández *et al.* (2014) encontraron una selectividad de sulfato entre 30-83% a una ratio N:S_{in} de $0,47$ a $1,61 \text{ mol-N-NO}_3^- \text{ mol-S}^{-1}$.

Puede observarse como en los tres estudios existe un comportamiento lineal entre la selectividad del sulfato y la ratio N:S_{in} (Fig. 26). Por, lo que fue realizada una comparación entre las líneas de regresión para los resultados experimentales de cada estudio, utilizando Statgraphics® Plus (v5.1).

Aunque hubo un desfase notable entre líneas, se realizó un análisis de la suma de cuadrados condicionales para cada una de las pendientes con

un intervalo de confianza del 95%, dando como resultado un p-valor de 0,0171, por lo que podría ser considerada la hipótesis nula asumida (pendientes de las líneas son todas iguales). La ecuación general fue ($R^2=96,08\%$):

$$\frac{gS-SO_4^{2-}}{gS-H_2S_{eliminado}} = -0,0098 + 0,4818N:S_{eliminado} + 0,08809A + 0,0613B \quad (Ec.21)$$

En esta ecuación, los términos A y B toman valor 0 para el estudio de Almenglo *et al.* (2016). Para los resultados descritos por Fernández *et al.* (2014), A toma valor 1 y B valor 0. Y en el presente estudio, A toma valor 0 y B valor 1.

Para los datos obtenidos en el control anticipado, es posible conocer la selectividad a sulfato en función de la ratio N:S_{in}, según:

$$\frac{gS-SO_4^{2-}}{gS-H_2S_{eliminado}} = -0,018 + 0,3859N:S_{in} \quad (Ec.22)$$

Valor éste que puede ser estimado con un coeficiente de ajuste de $R^2=0,9993$.

La figura 26 muestra la regresión lineal de los resultados experimentales de los tres BTF anóxicos con igual pendiente. Los resultados del presente estudio se localizaron en la región central entre los valores de los otros dos estudios, siendo la distancia entre las líneas de regresión de este estudio y los resultados obtenidos por Almenglo *et al.* (2016) y, Fernández *et al.* (2014) de 6,05% y 6,49%, respectivamente. Por lo tanto, puede ser adecuado predecir la producción de sulfato utilizando la ecuación 21 para el presente estudio (A = 0, B = 1) con una desviación inferior al 6,5%.

En cambio, para el experimento con control anticipado, la selectividad de sulfato fue constante, con un valor de $0,320 \pm 0,008 \text{ gS-SO}_4^{2-} (\text{gS-H}_2\text{S}_{eliminado})^{-1}$ y nuevamente, fue el azufre elemental el principal producto de oxidación. Hecho que puede ser explicado debido a la ratio constante N:S_{in} ($0,8 \text{ mol-N-NO}_3^- \text{ mol-S}^{-1}$) predefinida en este experimento para todo el perfil variable de carga de entrada de H₂S estudiado ($28,1\text{-}141,1 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$), lo cual corrobora los resultados de Fernández *et al.*

(2013). Donde el azufre fue el principal producto de oxidación ($68 \pm 16\%$), para una ratio N:S de $0,7 \pm 0,3 \text{ mol-N-NO}_3^- \text{ mol-S}^{-1}$.

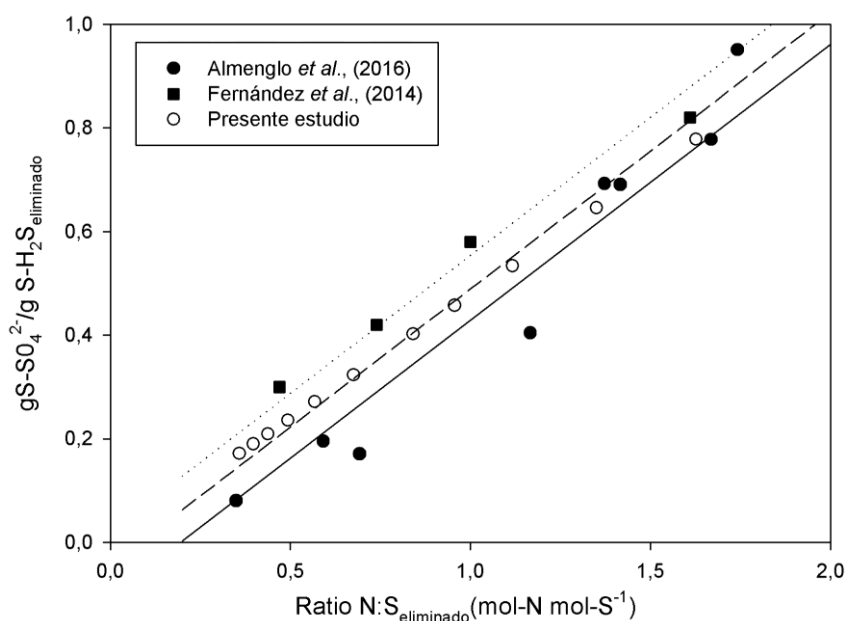


Figura 26. Comparativa de selectividad de sulfato vs. ratio N-NO₃:S_{eliminado}. Regresión lineal: línea de puntos (Fernández *et al.*, 2014); línea discontinua (presente estudio); línea continua (Almenglo *et al.*, 2016).

En la operación con nitrito, la selectividad a sulfato, en el experimento sin control ($0,25 \pm 0,14 \text{ gS-SO}_4^{2-} (\text{gS-H}_2\text{S}_{\text{eliminado}})^{-1}$) y control anticipado ($0,22 \pm 0,01 \text{ gS-SO}_4^{2-} (\text{gS-H}_2\text{S}_{\text{eliminado}})^{-1}$), demostraron que la oxidación a sulfato fue en este caso la reacción menos favorecida. Incluso, durante las experiencias sin control, la selectividad a sulfato nunca superó el 55%, a pesar de que, cuando se trabajó a los valores bajos de carga de entrada estudiadas ($35,2\text{-}28,1 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) (Fig. 27), la ratio molar N:S_{in} a estas condiciones fue superior al estequiométricamente necesario para la oxidación completa a sulfato ($2,9\text{-}3,7 \text{ mol-N-NO}_2^- \text{ mol-S}^{-1}$), según la ecuación 5. Por lo que en la oxidación de sulfuro en dos etapas (Ec. 5 y 6), el azufre elemental podría no oxidarse hasta que se haya agotado el sulfuro en el sistema como ha sido descrito por Mora *et al.*, (2014).

Sobre la base de estos resultados, es posible establecer la selectividad a sulfato en función de la ratio N:S_{in} que se imponga al sistema, según la ecuación 23. Si se tiene en cuenta el notable ajuste lineal entre los términos de esta ecuación ($R^2=0,9999$), a nivel industrial se podría definir la selectividad de los productos de oxidación de H₂S que sea conveniente, con el ajuste de la ratio molar N:S_{in}.

$$\frac{gS-SO_4^{2-}}{gS-H_2S_{eliminado}} = 0,0002 + 0,3135N:S_{in} \quad (Ec.23)$$

Los resultados demostraron un comportamiento bien distinto cuando la estrategia de control fue aplicada al sistema. En este caso la selectividad a sulfato permaneció casi constante en $22 \pm 1 \text{ gS-SO}_4^{2-} (\text{gS-H}_2\text{S}_{eliminado})^{-1}$ como consecuencia de la ratio molar N:S_{in} ($1,31 \text{ mol-N-NO}_2^- \text{ mol-S}^{-1}$) fijada previamente para este experimento. Aspecto que ha sido explicado anteriormente en el apartado 3.5.1, con el objetivo de tener una ratio aproximadamente un 60% superior a la empleada en la operación con nitrato.

En la operación con nitrito, los incrementos de la ratio N:S_{in}, dan como resultado una oxidación a sulfato inferior, a los obtenidos en la operación con nitrato, lo cual puede ser debido a cambios estructurales en la población, que hayan afectado la presencia de bacterias específicas que realizan la oxidación de azufre elemental (Madigan *et al.*, 2015), tras el cambio de nitrato a nitrito (Periodo III). Cambios que han sido constatados mediante el análisis de DGGE y se describen en el apartado 4.6.

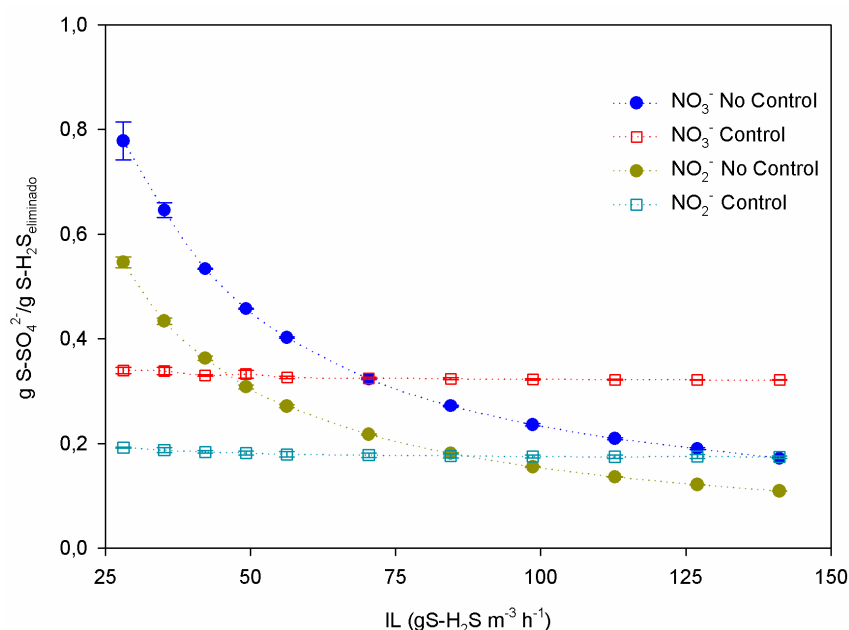


Figura 27. Selectividad a sulfato para la estrategia con y sin control anticipado.

La figura 28a muestra el comportamiento de la concentración de salida de H₂S, para los experimentos con control anticipado y sin control, empujando nitrato como aceptor de electrones.

Para el experimento sin control fue posible observar, como los picos de concentración de salida de H₂S coincidieron con los picos del perfil de H₂S-IL con el que se realizó el experimento, siendo la máxima concentración alcanzada de 396 ppm_v. Para los tres ciclos del experimento que fueron realizados el comportamiento de la variable de control fue similar.

En cambio, cuando el control anticipado fue llevado a cabo, la concentración de salida de H₂S fue reducida a un valor casi constante en torno a 95±17 ppm_v, correspondiendo a un porcentaje de eliminación del 95±2%, debido a la precisión en la dosificación de la cantidad de nitrato, para mantener la ratio N:S_{in} en 0,8 mol-N mol-S⁻¹. Estos resultados fueron mucho más estables que los obtenidos por López (2016), que para el estudio del mismo perfil de cargas en un BTF aerobio, empleando como variable manipulada la TLV, la acción de control se limitó a que la concentración de salida de H₂S no sobrepasara las 100 ppm_v. Este

parámetro fluctuó entre 0-10 ppm_v, cuando el perfil de carga de entrada alcanzó los valores más bajos (28,1-56,3 gS-H₂S m⁻³ h⁻¹), llegando hasta 100 ppm_v en el valor superior del perfil estudiado (141,1 gS-H₂S m⁻³ h⁻¹).

Los resultados con nitrito como aceptor de electrones, para ambas condiciones (no control y control anticipado), se muestran en la figura 28b. El comportamiento de la concentración de salida de H₂S, para los tres ciclos de los experimentos con control anticipado y sin control, fueron similares. En este caso, los valores de la concentración de salida de H₂S máximos alcanzados fueron de 233 ppm_v para el experimento sin control y 172 ppm_v para el control anticipado.

Según el uso final en el que será empleado el biogás, existen valores de tolerancia de la concentración de H₂S, en torno a 500 ppm_v generalmente se aceptan para los motores de combustión interna, con el fin de evitar la corrosión, el deterioro del motor y, además, reducir las emisiones de SO₂ a la atmósfera a través de los gases de escape (Bailon y Hinge, 2014; Walsh *et al.*, 1988).

La estrategia de control anticipado, permitió mantener la ratio N:S_{in} impuesta al sistema de una manera precisa, lo cual condujo a una respuesta más estable, fiable y robusta. La selectividad de los principales productos de oxidación de sulfuro pueden fijarse y mantenerse, además de controlar la concentración de H₂S de salida. Ambos parámetros son muy importantes ya que una baja selectividad de sulfato produce acumulación de azufre elemental y el consecuente riesgo de obstrucción (Montebello *et al.*, 2012), mientras que los picos de salida de H₂S que se producen (Fig. 28), pueden limitar el uso futuro del biogás tratado.

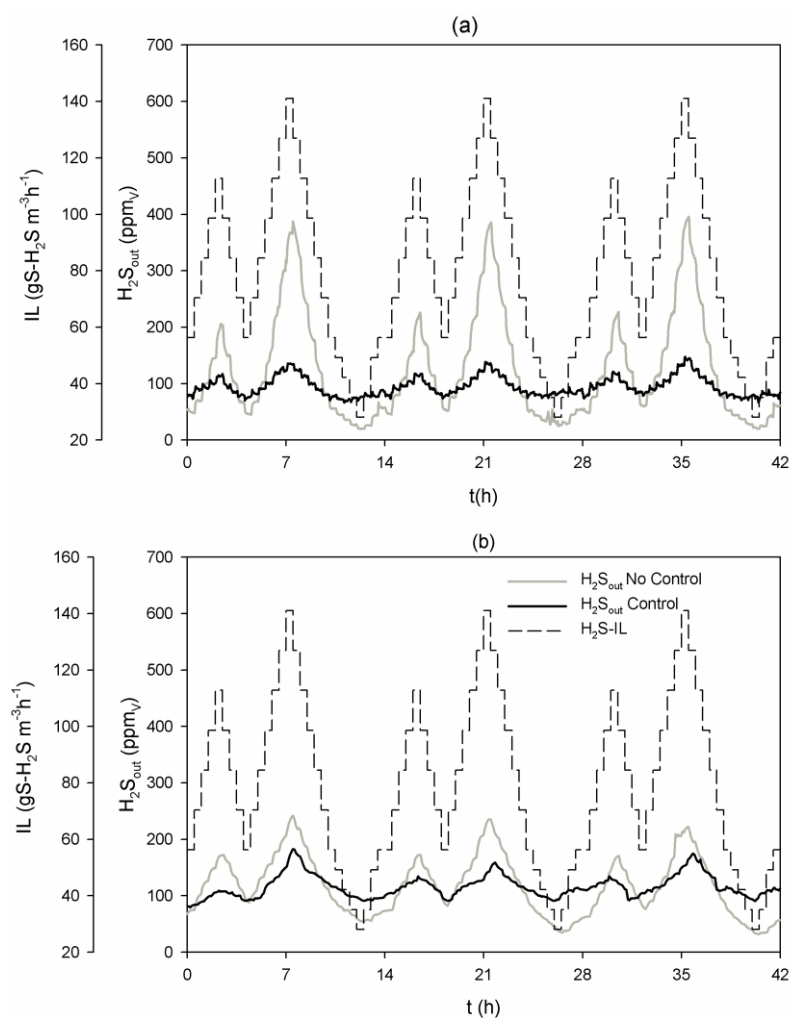


Figura 28. Concentración de H_2S_{out} . (a) operación con nitrato, (b) operación con nitrito.

Por otro lado, una mayor selectividad de sulfato conlleva un mayor consumo del aceptor de electrones, la acidificación del medio líquido y una menor concentración de H_2S de salida. Por lo tanto, es posible controlar fácilmente los productos de oxidación mediante una estrategia de control de anticipado, y, por ende, fijar el rendimiento del BTF a diferentes

escenarios operativos, según las necesidades de depuración en función del uso al que esté destinado el biogás.

La implementación del sistema de control se tradujo en mejoras de la operación del BTF para los dos aceptores de electrones utilizados (Tabla 23), reduciéndose la concentración de H_2S máxima de salida respecto al sistema sin control en un 59% y en un 26% para la operación con nitrato y con nitrito respectivamente. La masa emitida ($gS-H_2S$) por el sistema para cada experimento se redujo un 24,7% en el control con nitrato y un 2,6% para el nitrito, respecto al experimento sin control. Una comparación global, ha permitido estimar una reducción de los dos parámetros mencionados anteriormente en la operación con control anticipado con nitrato respecto al mismo modo con nitrito, en un 18,3% de la concentración máxima y en un 17,8% la masa emitida por sistema.

Tabla 23 Comparativa para el control anticipado con nitrato y nitrito.

		$H_{2S_{out}}$ máx. (ppmv)	Masa emitida ($gS-H_2S$)
Nitrato	Control	148	0,14
	No Control	396	0,19
Nitrito	Control	172	0,15
	No Control	233	0,18

4.4.2 Control retroalimentado.

De forma similar al control anticipado, todos los experimentos llevados a cabo con el control retroalimentado, se realizaron con y sin control, para establecer una comparación del sistema en ambas condiciones de operación. En el estudio e implementación de esta estrategia de control, fueron empleadas las variaciones en la concentración de entrada de H_2S descritas en el apartado 3.5 (Fig. 9).

4.4.2.1 Escalón y pico.

En la operación con nitrato se llevó a cabo la perturbación en la concentración de H_2S de entrada en forma de escalón (Fig. 9e, Apartado 3.5.2.1). Para el experimento controlado (Fig. 29a), la cantidad de nitrato que entra al sistema se incrementó en un 39% (de 0,111 a 0,154 $\text{gN-NO}_3^- \text{h}^{-1}$), producto del incremento del caudal de nitrato de 0,38 a 0,53 L h^{-1} . La acción de control sobre el sistema provocó la estabilización de la salida de H_2S en $96 \pm 1 \text{ ppm}_v$, a los 49 min; mientras que, en el sistema sin control, la concentración de salida de H_2S llegó hasta $189 \pm 1 \text{ ppm}_v$. Obteniéndose una reducción en la salida de H_2S del 98% en el experimento controlado respecto al no controlado.

En la entrada en pico, se aumentó la carga de entrada de H_2S de 79,8 a 159,6 $\text{gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{h}^{-1}$ (1900 a 3800 ppm_v) (Fig. 29b). El sistema sin control alcanzó una concentración de H_2S de salida máxima de 150,8 ppm_v , estabilizándose 24 min después de realizar la perturbación en $119 \pm 1 \text{ ppm}_v$ sin que se alcancen las condiciones iniciales de partida (100 ppm_v), con un tiempo de retardo entre la máxima concentración de entrada de H_2S y la concentración máxima de salida de H_2S de 58 s.

En el experimento llevado a cabo con el lazo de control, la concentración de salida de H_2S alcanzó su máximo valor (119,9 ppm_v) 64 s después de ser realizada la perturbación. La estabilización de la variable controlada se produjo en $97,4 \pm 0,5 \text{ ppm}_v$ transcurridos 24 min. El experimento controlado redujo en un 25% la concentración máxima de salida de H_2S .

Por tanto, el sistema de control estudiado es capaz de actuar de forma eficiente ante incrementos sostenidos en el tiempo de hasta un 20% del valor de la carga de entrada de H_2S , e igual de efectivo se ha mostrado ante picos de corta duración que pueden producirse en la operación diaria de una EDAR (Lafita *et al.*, 2012).

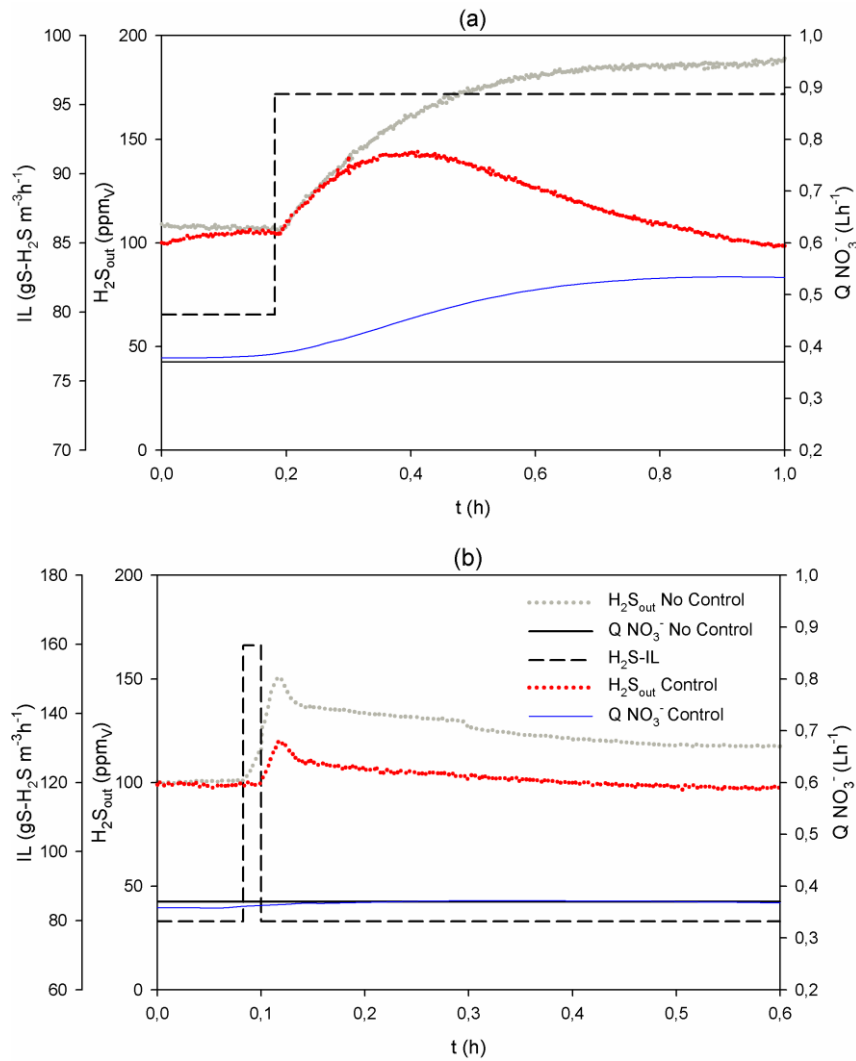


Figura 29. Perturbaciones en la operación con nitrato. (a) escalón, (b) pico.

Estas mismas perturbaciones fueron realizadas en la operación con nitrito (Fig. 30). Para la perturbación tipo escalón (Fig. 30a), la concentración de salida de H_2S para el sistema sin control se estabilizó 21,2 min después de realizado el cambio en la carga de entrada de H_2S , en el valor de 163 ± 1 ppm_v, en cambio, para el experimento controlado el valor máximo registrado fue de $137,9$ ppm_v, estabilizándose el sistema en 99 ± 1

ppm_v transcurridos 25 min después de haber sido realizada la perturbación, lo cual representa un 65 % de reducción de la salida de H₂S debido al aumento que se produjo en el caudal de alimentación de nitrito desde 0,562 hasta 0,766 L h⁻¹, lo cual se traduce en un incremento de la cantidad de nitrito que entró al sistema del 36,38% (0,172-0,235 gN-NO₂⁻ h⁻¹).

La perturbación simulando un cambio tipo pico de la carga de entrada de H₂S (Fig. 30b) alcanzó valores muy similares en la concentración máxima de salida de H₂S para los experimentos con control (122,6 ppm_v) y sin control (126,8 ppm_v). El tiempo transcurrido entre el valor máximo de H₂S de entrada y el valor máximo de salida fue de 58,0 s para el sistema con control y de 64,1 s para el experimento sin control.

Por otro lado, la estabilización del sistema con control se produjo a los 13 min de realizada la perturbación a un valor similar al *set point* de las condiciones iniciales del experimento (100±1 ppm_v), mientras que para el experimento sin control la estabilización se produjo en torno a 102±2 ppm_v, 16,0 min después de realizada la perturbación de entrada.

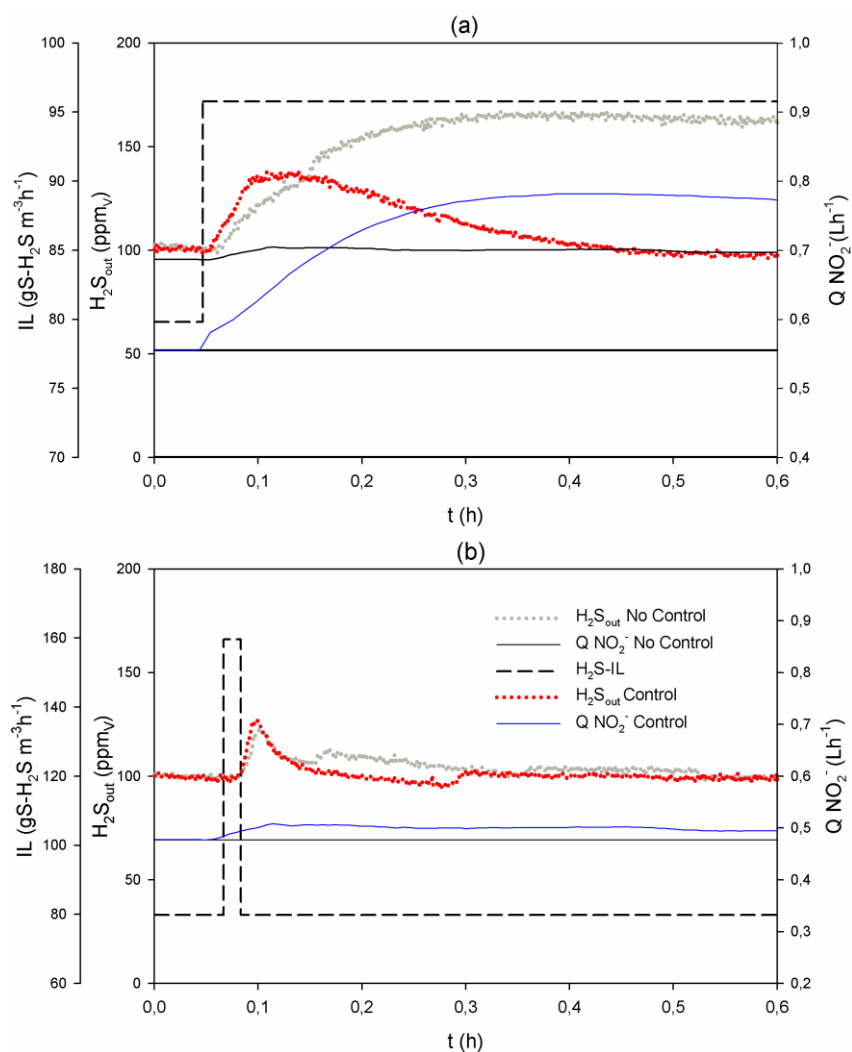


Figura 30. Perturbaciones en la operación con nitrito. (a) escalón, (b) pico.

Para ambas perturbaciones, el sistema de control fue capaz de amortiguar el cambio en H₂S-IL que se produjo en el BTF, manteniendo un porcentaje de eliminación superior al 94,8% en la operación con los dos aceptores de electrones estudiados. No obstante, para los experimentos con y sin control realizados con nitrito, los valores máximos de salida

alcanzados de H_2S fueron inferiores a los alcanzados en los respectivos experimentos con nitrato.

4.4.2.2 Función escalera sinusoidal.

La perturbación que fue estudiada en estos experimentos, siguió la variación descrita en el apartado 3.5 (Fig. 9d). De manera similar a las perturbaciones previamente estudiadas, se realizó una comparación entre experimentos llevados a cabo en el BTF con un controlador PID y sin control, empleando como aceptores de electrones nitrato (Fig. 31) y nitrito (Fig. 32).

La figura 31a, muestra el perfil de la variable de control, en la operación con nitrato. Los resultados obtenidos, indicaron que la concentración de salida de H_2S fue 100 ± 2 ppm_v para el experimento con control, mientras que en el experimento sin control estuvo entre 76,2-176,7 ppm_v, con un valor medio de 118,5 ppm_v.

Precisamente, en el experimento sin control, la concentración de salida de H_2S siguió la misma evolución que el perfil de cargas estudiado, registrándose picos de H_2S a la salida del BTF cuando la carga de entrada alcanzó sus valores más altos.

Para esta misma perturbación, la ratio $\text{N:S}_{\text{eliminado}}$ (mol-N mol-S^{-1}) fue casi constante, con valores de $0,49 \pm 0,03$ y $0,52 \pm 0,05$ para los experimentos con y sin control, respectivamente (Fig. 31b). Como era de esperar, para valores tan cercanos de estas ratios, la selectividad de sulfato para ambos experimentos (Fig. 34), fue también muy similar, variando entre 27,5-40,0%, para el rango de cargas de entrada estudiado.

Los resultados obtenidos para la concentración de salida de H_2S en el BTF operado con nitrito, se muestran en la figura 32a.

Para el sistema bajo la acción del controlador PID, la variable de control se mantuvo en torno a 100 ± 2 ppm_v, coincidiendo con el *set point* establecido, en cambio para el sistema sin acción de control, la concentración de H_2S de salida osciló entre 101,6-230,0 ppm_v.

La estabilidad de la variable de control, bajo la acción del controlador PID, fue posible por la variación del caudal de nitrito alimentado entre 0,48-0,73 L h⁻¹, resultando en una ratio $\text{N:S}_{\text{eliminado}}$ de

$1,5 \pm 0,1 \text{ mol-N mol-S}^{-1}$, por otro lado, como los experimentos sin control fueron realizados a caudal de alimentación constante, la ratio $\text{N:S}_{\text{eliminado}}$, osciló entre $1,11$ - $1,50 \text{ mol-N mol-S}^{-1}$ (Fig. 32b).

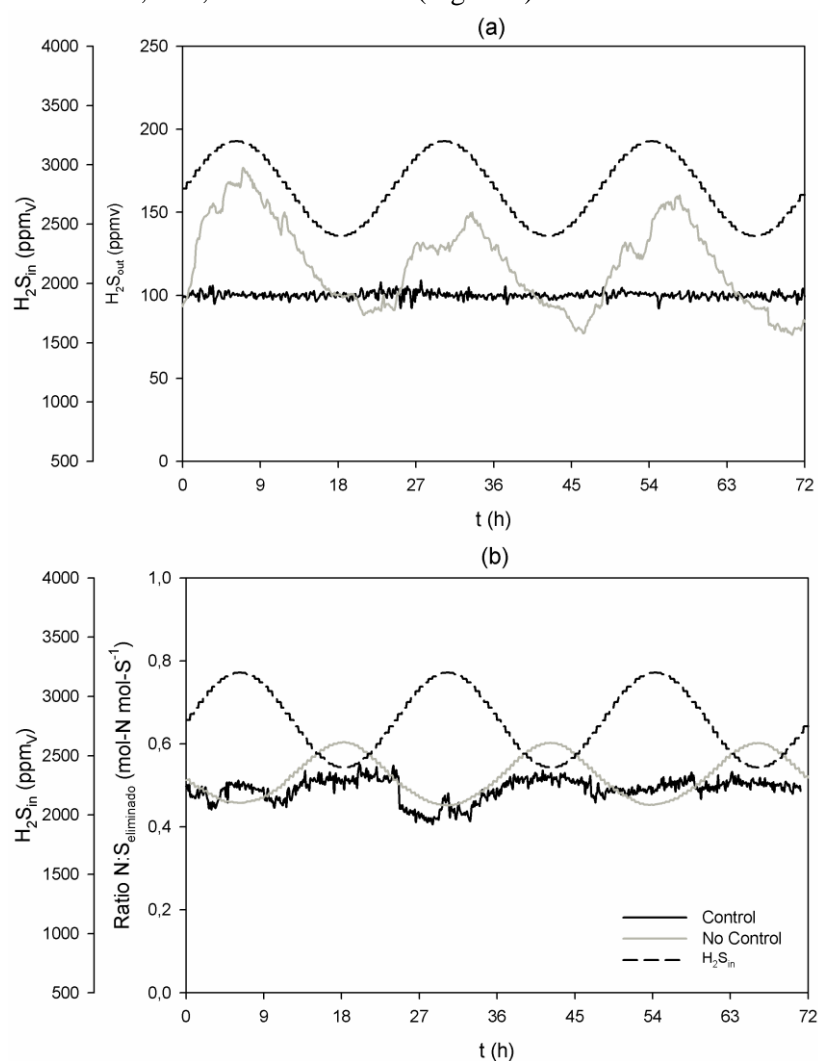


Figura 31. Perturbación escalera sinusoidal con nitrato. (a) perfil de $\text{H}_2\text{S}_{\text{out}}$, (b) perfil de ratio $\text{N:S}_{\text{eliminado}}$.

Para esta perturbación, en el experimento sin control y en la operación con nitrato se registró una mayor concentración de H_2S de salida

respecto al mismo experimento con nitrato. Posiblemente se hayan producido cambios en la conformación del lecho del BTF en la operación con nitrito. Donde la aparición de caminos preferenciales pudo dificultar la adecuada distribución del aceptor de electrones (López *et al.*, 2016b). A pesar de la ocurrencia de estos fenómenos, en el experimento bajo la acción del controlador PID se contrarrestaron estos inconvenientes mediante el aumento del caudal de nitrito, que se tradujo en un aumento de la ratio $N:S_{\text{eliminado}}$ (Fig.32b) respecto al experimento controlado con nitrato (Fig. 31b).

La selectividad a sulfato de estos experimentos (Fig. 36), tuvo resultados similares a los obtenidos en el experimento homólogo con nitrato, variando entre 33,7-50,1% para el sistema controlado, y entre 39,9-52,7% para el experimento sin control.

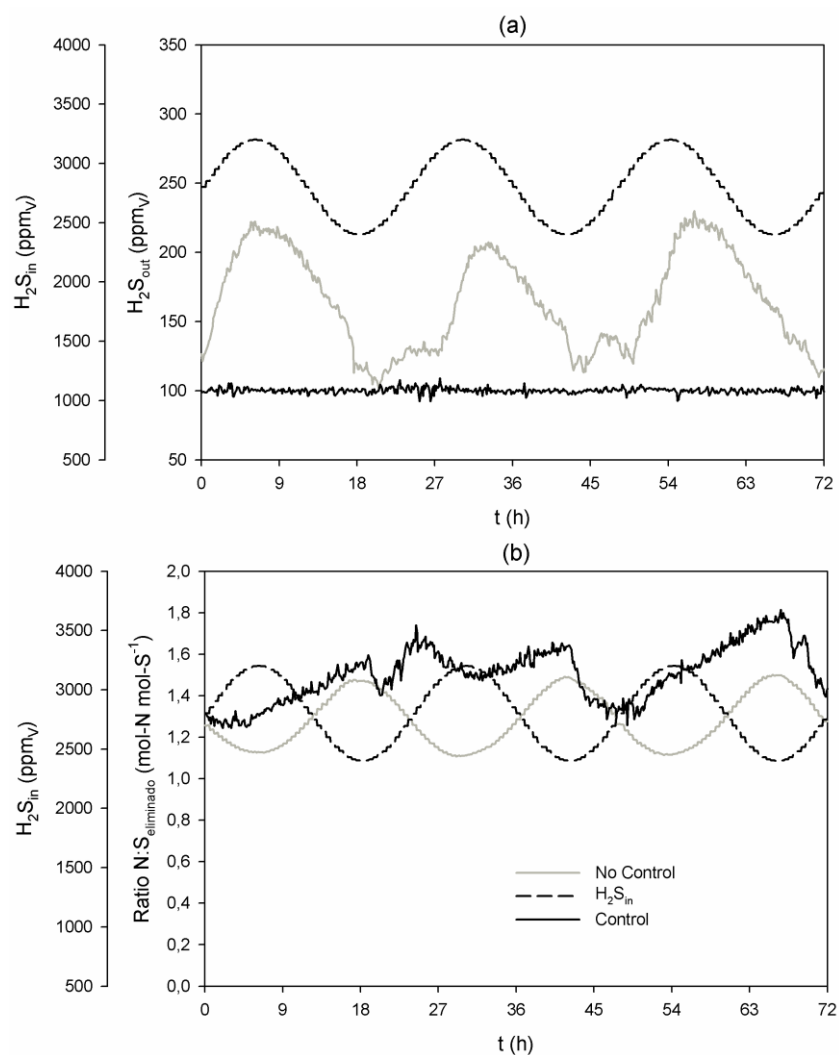


Figura 32. Perturbación escalera sinusoidal con nitrito. (a) perfil de H_2S_{out} , (b) perfil de ratio $N:S_{eliminado}$.

4.4.2.3 Función escalera.

De manera similar a la perturbación en forma sinusoidal, el estudio de la variación en escalera de la concentración de entrada de H_2S fue

llevado a cabo para los dos aceptores de electrones estudiados y en dos modos de operación: control por PID y sin control.

Para el estudio con nitrato, el valor de salida de la variable de control (Fig. 33a) fue 100 ± 7 ppm_v en el experimento de control y entre 32,9-193,2 ppm_v para el experimento sin control. De esta manera, el control se llevó a cabo con éxito y la concentración de H₂S de salida se ajustó al valor de consigna de una manera muy precisa.

El control retroalimentado permitió que la concentración de H₂S de salida se mantuviera cerca del valor de punto de ajuste, modificando el caudal de nitrato a lo largo de los experimentos entre 0,18-0,44 L h⁻¹.

Para estos mismos experimentos, la variación de la ratio N: S_{eliminado} (Fig. 33b), fue mayor que la correspondiente a la escalera sinusoidal debido al rango mucho más amplio del perfil de carga que fue estudiado. Para el control con PID el intervalo estuvo entre 0,45 y 1,56 mol- N-NO₃⁻ mol-S⁻¹ y para la operación sin control el intervalo estuvo entre 0,45 y 2,29 mol-N-NO₃⁻ mol-S⁻¹. En los experimentos con y sin control PID, los consumos totales de nitrato fueron 2,63 y 3,11 g-N-NO₃⁻ respectivamente. De esta forma, el control PID permitió obtener una concentración estable de H₂S además de una reducción de un 15,4% en el consumo de nitrato.

En este mismo estudio, la selectividad de sulfato mostró una relación lineal con el N:S_{eliminado} (Fig. 34), específicamente en el experimento de control con PID estuvo en el intervalo de 29-84%, mientras que en el experimento sin control el intervalo fue de 23-118%. Almenglo *et al.* (2016) realizaron experimentos con relaciones N:S entre 0,34-1,74 mol-N-NO₃⁻ mol-S⁻¹ y lograron selectividad de sulfato entre 8-95% mientras que Fernández *et al.* (2014) para ratios N:S de 0,47 a 1,61 mol- N-NO₃⁻ mol-S⁻¹, obtuvieron una selectividad de sulfato entre 3 y 82%.

De manera similar, en resultados alcanzados en BTFs aerobios, la selectividad a sulfato también va de la mano con cuestiones operacionales. Si se tiene en cuenta que garantizar la cantidad de oxígeno necesario para la oxidación completa del sulfuro puede acarrear altos costes de operación. De ahí que la instalación de dispositivos para la transferencia de oxígeno permita conversiones a sulfato superiores al 52% para cargas de entrada de H₂S hasta 78 gS-H₂S m⁻³ h⁻¹ (Rodríguez *et al.*, 2014), o incluso la manipulación de la TLV ha logrado una selectividad de sulfato del 43%

para una carga de entrada de H_2S de $284 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (López *et al.*, 2016).

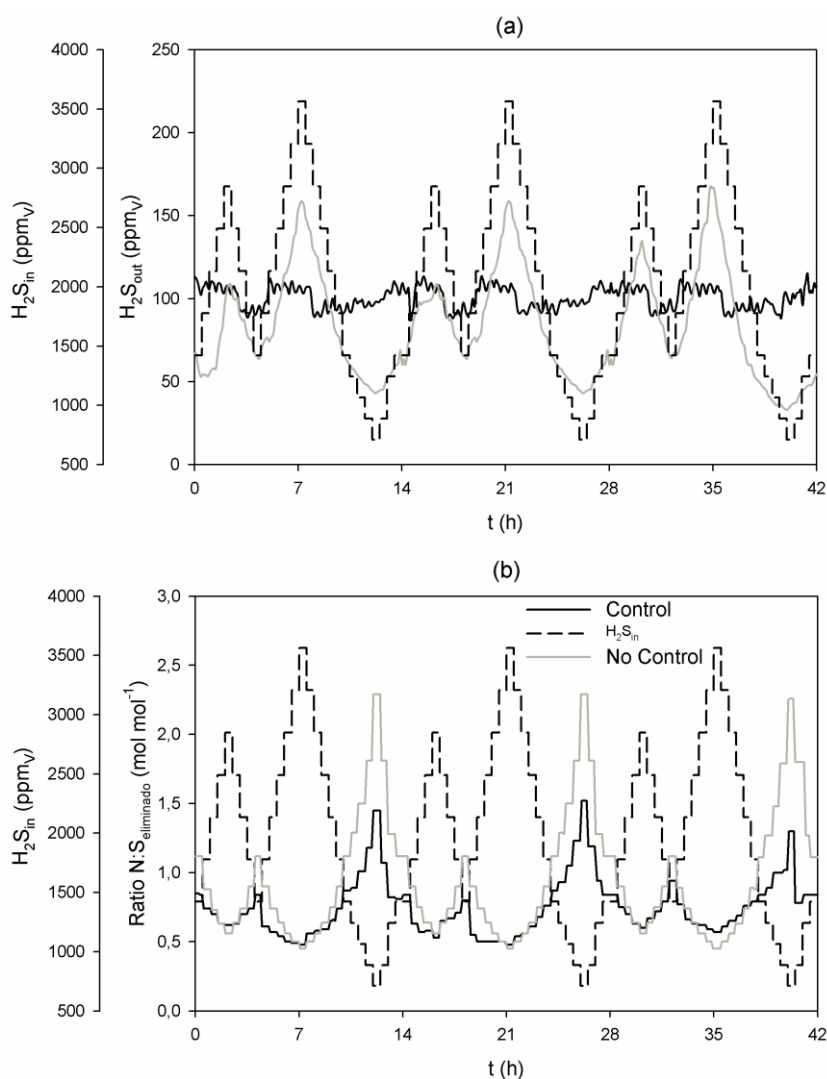


Figura 33. Perturbación escalera con nitrato. (a) perfil de H_2S_{out} , (b) perfil de ratio $\text{N:S}_{eliminado}$.

Es interesante resaltar cómo para el experimento sin control, para la ratio $\text{N:S}_{eliminado}$ de $2,29 \text{ mol-N-NO}_3^- \text{ mol-S}^{-1}$ correspondiente a la carga de

entrada de $28,1 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, el porcentaje de sulfato fue superior al 100%, posiblemente debido a la oxidación del azufre elemental que previamente se había acumulado en el lecho fijo.

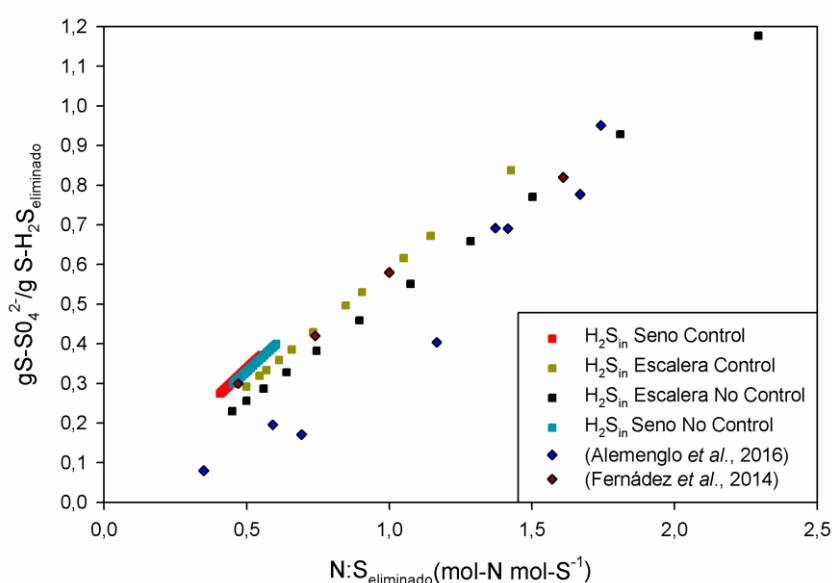


Figura 34. Selectividad de sulfato para experimentos con nitrato con y sin control retroalimentado.

Los resultados obtenidos para la operación con nitrito, indican que la variable de control (Fig. 35a), se mantuvo entre $112,9\text{-}89,8 \text{ ppm}_v$ en el experimento controlado, con un valor medio de este parámetro ($100 \pm 7 \text{ ppm}_v$) muy cercano al *set point* asignado al experimento, debido a que el caudal de alimentación de nitrito varió entre $0,22\text{-}0,57 \text{ L h}^{-1}$, en cambio, los resultados para el sistema sin control, muestran que la variable controlada se mantuvo entre $70,4\text{-}287,4 \text{ ppm}_v$.

La variación que presentó la ratio $\text{N:S}_{\text{eliminado}}$ (Fig. 35b) en el experimento bajo la acción de control fue de $0,43\text{-}2,98 \text{ mol-N-NO}_2^- \text{ mol-S}^{-1}$, siendo la selectividad a sulfato inferior al 60% para cargas de trabajo de H_2S mayores de $49,2 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, mientras que para el experimento sin control la ratio estuvo entre $0,75\text{-}3,99 \text{ mol-N-NO}_2^- \text{ mol-S}^{-1}$, como consecuencia de los valores mayores de esta ratio, se obtuvo más de un

95% S-SO_4^{2-} para las cargas de trabajo entre 28,1-42,2 $\text{gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{h}^{-1}$, y entre 28-82% S-SO_4^{2-} para el resto de cargas del perfil estudiado.

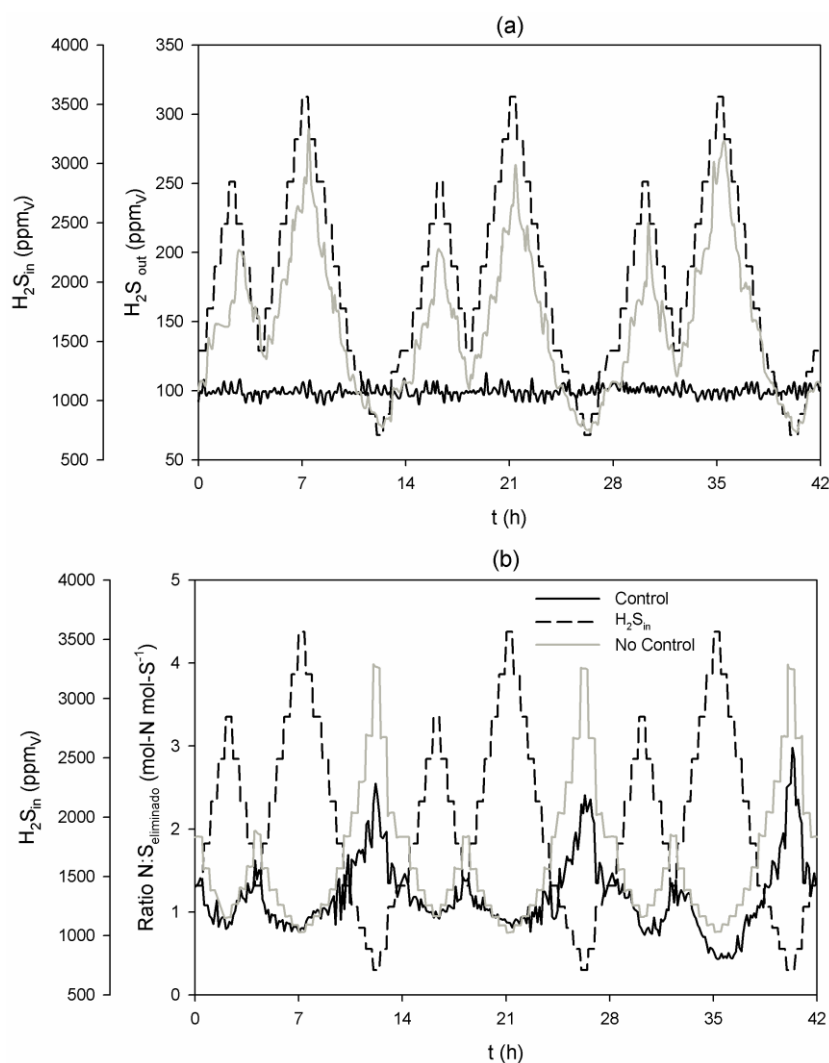


Figura 35. Perturbación escalera con nitrito. (a) perfil de $\text{H}_2\text{S}_{\text{out}}$, (b) perfil de ratio $\text{N:S}_{\text{eliminado}}$.

Los resultados previamente abordados para los experimentos sin control, realizados con ambos aceptores de electrones, donde gran

variación en la ratio $N:S_{\text{eliminado}}$ fue observada, sugieren un comportamiento similar al descrito por Li *et al.* (2016). El estudio llevado a cabo por estos autores en biorreactores anóxicos, concluye que la influencia de la ratio molar $N:S$ es determinante en los productos de oxidación, pero poco influyente en la eficiencia de desulfuración del BTF.

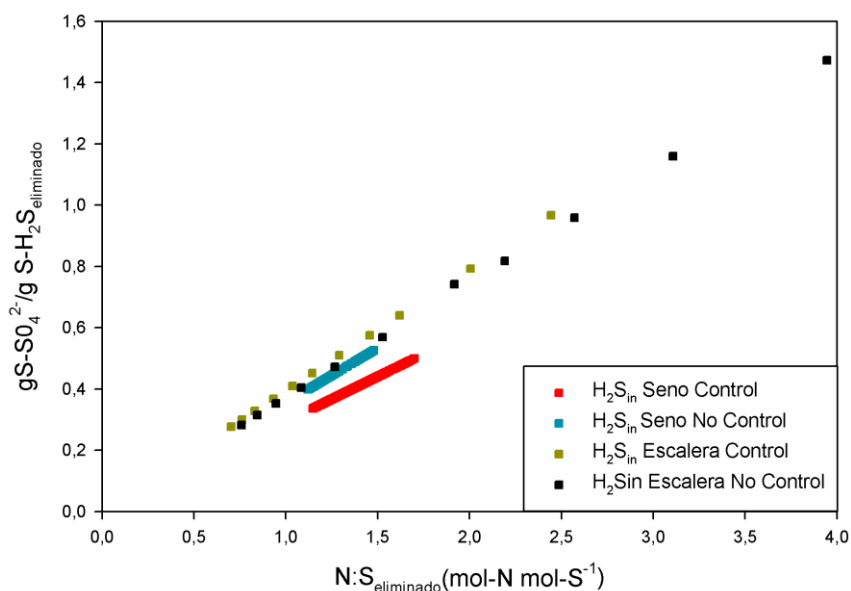


Figura 36. Selectividad de sulfato para experimentos con nitrito, con y sin control retroalimentado.

Dado que la concentración de H_2S de salida depende de la perturbación realizada, se comparó el porcentaje de reducción de alturas de pico en lugar de la concentración absoluta de H_2S para una comparación cuantitativa de la eficiencia del controlador. Además, fue evaluada la masa acumulada de $S-H_2S$ emitida para los tres ciclos de cada una de las perturbaciones más significativas (escalera y función seno) realizadas sobre el sistema (Tabla 24), en la operación con los dos aceptores de electrones. Para la perturbación de la concentración de entrada de H_2S en forma de escalera en la operación con los dos aceptores de electrones, la implementación del controlador PID redujo la concentración máxima de salida de H_2S un 30% en la operación con nitrato y hasta un 60% en el caso

del nitrito. Respecto a la masa emitida, el control retroalimentado permitió reducirla en un 6% cuando se operó con nitrato y un 31% en el caso del nitrito.

El control retroalimentado, para la operación en el rango de altas concentraciones de H_2S de entrada (variación en forma de escalera sinusoidal), mostró resultados similares. En la operación con nitrato se logró una reducción del 34% para la concentración máxima de salida, y un 17% menos de masa emitida, en cambio para el nitrito estos valores fueron del 52% y del 39% respectivamente.

Tabla 24 Comparativa para el control retroalimentado con nitrato y nitrito.

Escalera			
		$H_{2S_{out}}$ máx. (ppmv)	Masa emitida (gS- H_2S)
Nitrato	Control	113	0,14
	No Control	162	0,15
Nitrito	Control	110	0,15
	No Control	276	0,22
Escalera sinusoidal			
Nitrato	Control	107	0,26
	No Control	162	0,32
Nitrito	Control	106	0,27
	No Control	220	0,44

En el análisis de la masa emitida para los experimentos realizados con la variación en forma de escalera, debe tenerse en cuenta que al sistema entran en cada ciclo de 14 h, 3,13 gS- H_2S , si además se cumplen las condiciones de control impuestas (100 ppmv), significaría que se emiten 0,12 gS- H_2S en cada ciclo. En el caso de los experimentos con la variación de la concentración de entrada de H_2S en forma de escalera sinusoidal, en cada ciclo de 24 h entran al sistema 7,43 gS- H_2S y para el *set point* de 100 ppmv se emitirían 0,26 gS- H_2S .

4.4.2.4 Cambios del *set point*.

Los cambios en el *set point* H_2S se evaluaron utilizando el conjunto de ganancias para el controlador PID seleccionado, tanto para la operación con nitrato (ajuste del día 177) como con nitrito (ajuste del día 393).

Los resultados se muestran en la figura 37 y es posible apreciar, que el sistema de control respondió de manera precisa a los cambios realizados, tanto para las variaciones de *set point* ascendentes como descendentes, en el intervalo de 25-200 ppm_v.

Para el estudio empleando nitrato (Fig. 37a), el sistema de control ajustó el caudal de alimentación entre 0,13-0,48 L h⁻¹, resultando en una variación equivalente de la carga de nitrato entre 0,03-0,11 g N-NO₃⁻ h⁻¹. El tiempo hasta alcanzar las condiciones estables, después de cada cambio de *set point*, estuvo entre 16,8-32,6 min. Los menores valores fueron observados en los cambios ascendentes de *set point* realizados, como consecuencia de la menor necesidad de nitrato. En cambio, el sistema de control tardó más tiempo en ajustar las nuevas condiciones de *set point* impuestas, en los cambios descendentes de este parámetro, específicamente de 200 a 100 ppm_v (32,6 min) debido a la mayor disponibilidad de nitrato en el medio de recirculación.

Por otro lado, en los cambios de *set point* llevados a cabo con nitrito (Fig. 37b), se produjo un cambio del caudal de alimentación entre 0,1-0,70 L h⁻¹, correspondiente a una variación en la carga de entrada de nitrito entre 0,06-0,32 g N-NO₂⁻ h⁻¹, necesaria para realizar los ajustes que demandó el experimento en cuestión. Los tiempos de estabilización tras realizar los cambios de *set point* estuvieron entre 6,4-62 min, registrándose el mayor valor en el cambio de 100 a 50 ppm_v, producto del exceso de nitrito a las nuevas condiciones de ajuste que provocó una disminución de la concentración de H_2S de salida hasta 41 ppm_v, valor muy cercano al nuevo *set point* establecido en ese instante (50 ppm_v). Por otro lado, el ajuste al valor de 200 ppm_v, fue inferior a dicho valor (193 ± 5 ppm_v), lo cual puede ser atribuido a la variación de la variable manipulada (*offset* hasta 48%) en este punto.

Alcanzar una concentración de salida de H_2S ajustada a un valor de *set point* bajo (25 ppm_v), permite establecer un símil con los resultados de eliminación de H_2S que se alcanzan en sistemas de afino físico-químicos,

como la absorción con carbón activo (Bagreev *et al.*, 2005; Bandosz, 2002). De forma general, el ajuste del sistema de control ante los cambios de *set point*, fue satisfactorio para los dos sistemas en estudio (nitrato y nitrito), a pesar de que, las reglas de Ziegler-Nichols pueden conducir a menudo a una respuesta de tipo oscilatoria ante cambios del valor de *set point* (Liu y Daley 2001).

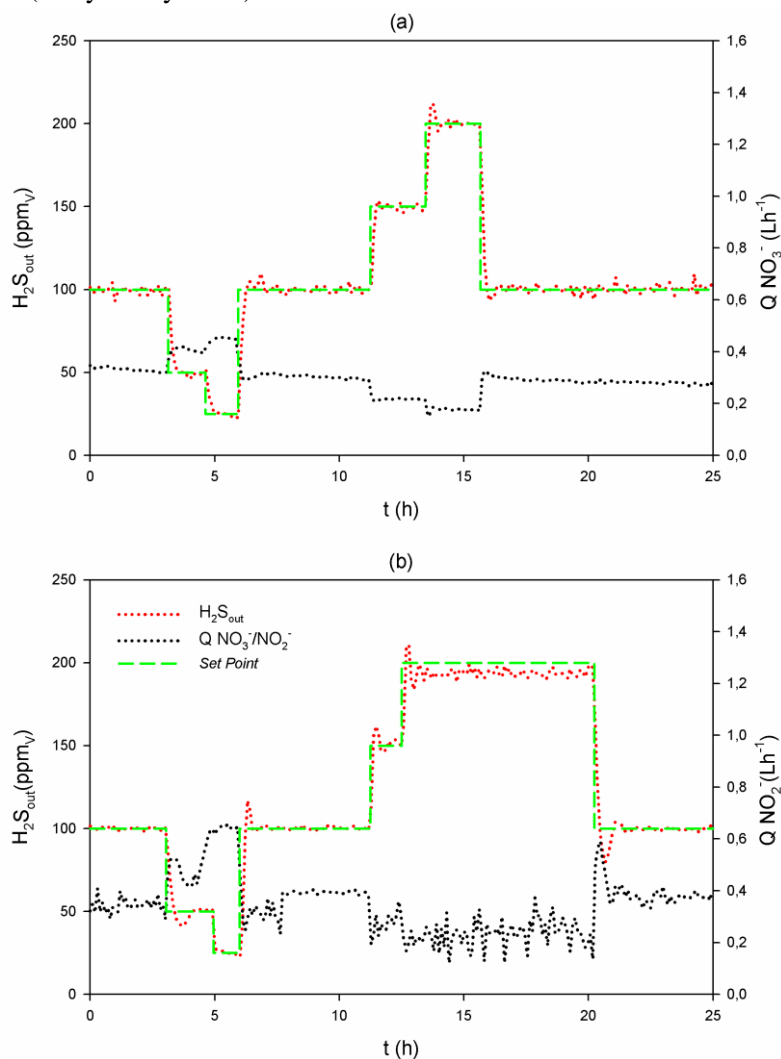


Figura 37. Respuesta del sistema de control ante cambios del *set point*. (a) operación con nitrato, (b) operación con nitrito.

4.4.2.5 Función escalera para controladores con ajuste del día 445.

Con las ganancias de cada uno de los controladores seleccionados en el ajuste del día 445, se realizó un experimento de perfil de carga variable (Fig. 38), tal y como fue descrito con anterioridad (Apartado 3.5.2), para un *set point* de 100 ppm_v de la concentración de H₂S de salida.

Bajo la acción del controlador PID-OM (Fig. 38a), el sistema se tornó inestable en los valores más bajos del perfil de carga analizado, en el rango 28,1-56,3 gS-H₂S m⁻³ h⁻¹, en la variable manipulada (caudal de nitrito) se produjeron oscilaciones cuya amplitud fue incrementándose a medida que la carga de entrada de H₂S disminuía, en el intervalo 56,3-84,5 gS-H₂S m⁻³ h⁻¹, el sistema recuperó parte de la acción de control y fue en los valores superiores del perfil estudiado, cuando se mostró mejor controlado. Este comportamiento era esperado, si se tienen en cuenta los resultados de la variable manipulada que para este controlador fueron obtenidos en el ajuste del día 445 (Fig. 23b), donde se pudo apreciar una variación mucho más significativa para el PID-OM, que en el resto de controladores que fueron ajustados.

Una situación muy distinta, presentó el BTF bajo la acción del controlador PI-OM (Fig. 38b). Para estas condiciones, la variable de control estuvo entre 90,4-114,3 ppm_v. Por tanto, se descartó el controlador PID-OM, seleccionando el controlador PI-OM para llevar a cabo el estudio de la respuesta del sistema de control ante cambios del EBRT (Apartado 4.5). Del análisis anterior, podemos inferir que a pesar de que los criterios basados en el tiempo integral, son aceptados para la selección de un controlador, en ocasiones, no es el criterio más acertado. La causa podría estar en el proceso de ajuste de los controladores (Shahrokhi y Zomorodi, 2013), y la influencia de cualquier otra perturbación, que de forma aleatoria haya estado presente durante la adquisición de datos. Y son precisamente estos datos los que posteriormente son utilizados en el cálculo de los errores.

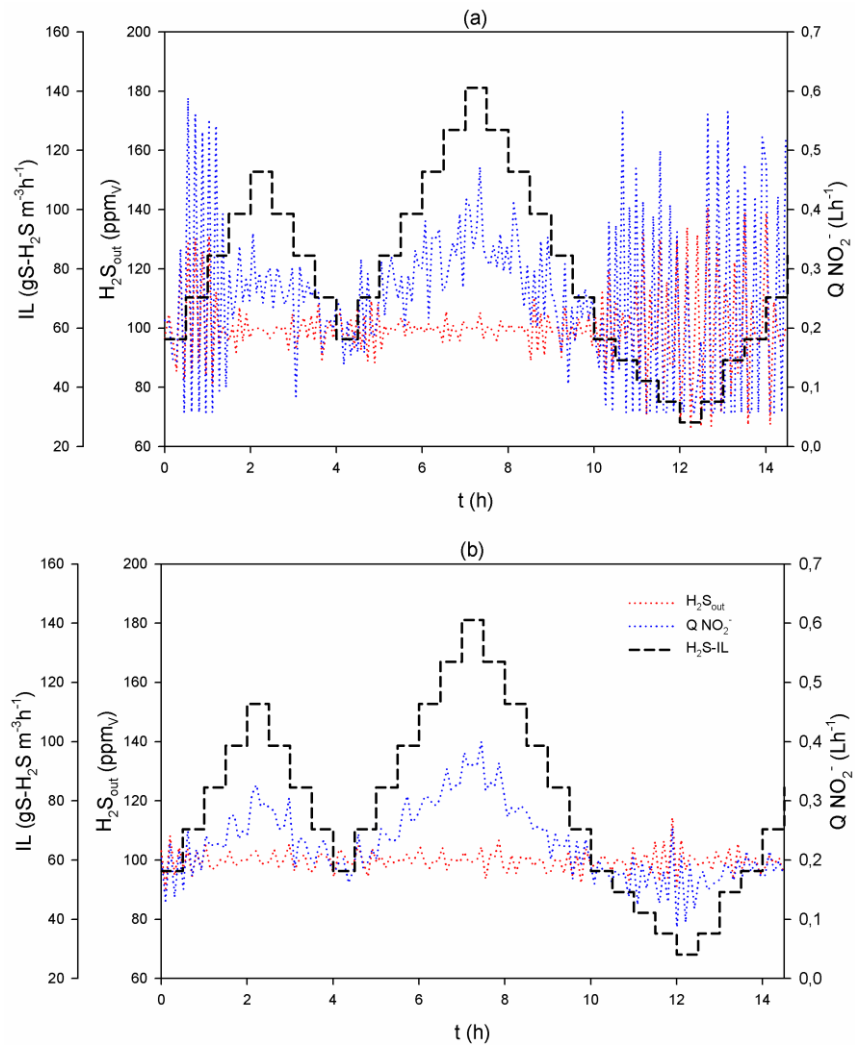


Figura 38. Perturbación escalera para controladores seleccionados por criterios de tiempo integral. (a) PID-OM, (b) PI-OM.

4.4.2.6 Control ORP.

El estudio de este modo de control retroalimentado también fue realizado con nitrato y nitrito. En primer lugar, se realizó un barrido de la concentración de salida de H_2S y el valor del ORP en el sistema sin control

para obtener ambos perfiles, mientras iba agotándose el aceptor de electrones y se acumulaba sulfuro en el medio de recirculación. Estos datos son de gran interés ya que nos pueden ayudar a seleccionar el *set point* de ORP para tratar de evitar altas concentraciones de salida de H_2S . Sin embargo, es importante tener en cuenta que no es posible tener una relación directa entre ambos, ya que el valor del ORP se ve influenciado por la concentración de otras muchas especies en el medio de recirculación, que a su vez influyen sobre el pH del mismo (Chang *et al.*, 2004). De ahí que, cualquier perturbación externa en la composición del medio de recirculación podría afectar al ORP y, por tanto, la acción de control basada en el mismo. No obstante, el control mediante el uso de ORP ha demostrado ser un modo robusto de control en la dosificación de oxígeno, (Khanal y Huang, 2003), o en la dosificación de nitrato (Almenglo *et al.*, 2016), para lograr la oxidación de sulfuro.

La figura 39 muestra el comportamiento de varios parámetros tras añadir un pulso del aceptor de electrones. Como se puede apreciar, conforme disminuye el ORP se produjo un incremento de la concentración de salida de H_2S .

Los resultados en la operación con nitrato que muestra la figura 39a, demostraron la dependencia entre el ORP y cambios que se producen en la operación del BTF. Específicamente, en este caso, debido a un fallo del sistema de control, se produjo una disminución del valor de pH (Fig. 39a). Concretamente, el valor disminuyó desde 7,4 hasta 7,3 en las primeras 2,3 h del experimento. A pesar de esta perturbación, se mantuvo la concentración de salida de H_2S en 16 ± 2 ppm_v, sin que se produjera una significativa influencia negativa en el porcentaje de eliminación del BTF. Una vez el sistema comenzó a controlar nuevamente el pH, se produjo nuevamente una estabilización del valor de ORP en torno a -340 mV, valor a partir del cual, la concentración de salida de H_2S comenzó a aumentar. La disponibilidad de nitrato en el medio se agotó incluso antes de comenzar el descenso del valor de ORP, por lo que esta medición es incapaz de detectar el agotamiento del aceptor de electrones. Transcurridas 3,7 h después de adicionar nitrato al sistema, comenzó a aumentar la concentración de salida de H_2S desde 45,4 ppm_v, y 0,8 h más tarde, se alcanzaron 252,5 ppm_v y un ORP de -378,3 mV.

Durante las dos primeras horas de este experimento, la concentración de nitrato en el medio descendió hasta $1,36 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$. Durante las dos horas siguientes el descenso fue más pausado, variando desde $0,37$ hasta $0,16 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$.

Los resultados en la operación con nitrito son mostrados en la figura 39b. En este caso, el control de pH no sufrió interrupciones, evitándose la perturbación que tuvo lugar en el estudio con nitrato. Tras realizarse el pulso de nitrito al sistema, el potencial se estabilizó en $-211 \pm 3 \text{ mV}$ y la concentración de salida de H_2S en $9,3 \pm 0,6 \text{ ppm}_v$. Dos horas después, el ORP comenzó a descender, alcanzando al final del experimento $-377,3 \text{ mV}$. Para ese instante la concentración de salida de H_2S se situó en $173,2 \text{ ppm}_v$. Después de $0,41 \text{ h}$ del inicio del experimento, la concentración de nitrito en el medio de recirculación descendió hasta $59,6 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$, a partir de ese momento continuó su descenso, pero mucho más lento durante $1,68 \text{ h}$ donde alcanzó un valor de $44,1 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$, $3,77 \text{ min}$ más tarde se obtuvo la última lectura medible de nitrito ($0,3 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$), coincidiendo con el instante en que la concentración de salida de H_2S comenzó a aumentar.

A partir de los resultados de estos dos estudios, fueron seleccionados los valores de -340 y -360 mV como *set point*, para llevar a cabo los experimentos de control basados en este parámetro.

Es importante destacar, que el principal inconveniente está en el pico de la concentración de salida de H_2S que se produce tras agotarse el aceptor de electrones, que sucede repetidamente en el tiempo, independientemente del valor de *set point* de ORP, como pudo ser apreciado también durante la etapa de inoculación (Fig. 14).

En la implementación de este modo de control, Almenglo et al. (2016) emplearon un valor de *set point* de ORP de -300 mV , para cargas de entrada de H_2S entre $40\text{-}117 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, obteniendo porcentajes de eliminación de H_2S entre $93\text{-}99\%$. Lo relativo que puede ser el valor de *set point*, queda demostrado en el estudio realizado por Fernández et al. (2013), quienes llevaron a cabo el mismo modo de control, empleando rangos de valores de ORP. Para cargas de entrada de H_2S inferiores a $80 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ el *set point* estuvo entre -250 y -260 mV , mientras que, para cargas superiores a ese valor, el *set point* estuvo entre -320 y -300 mV ,

alcanzando en ambos casos, altos porcentajes de eliminación de H_2S (99,5%).

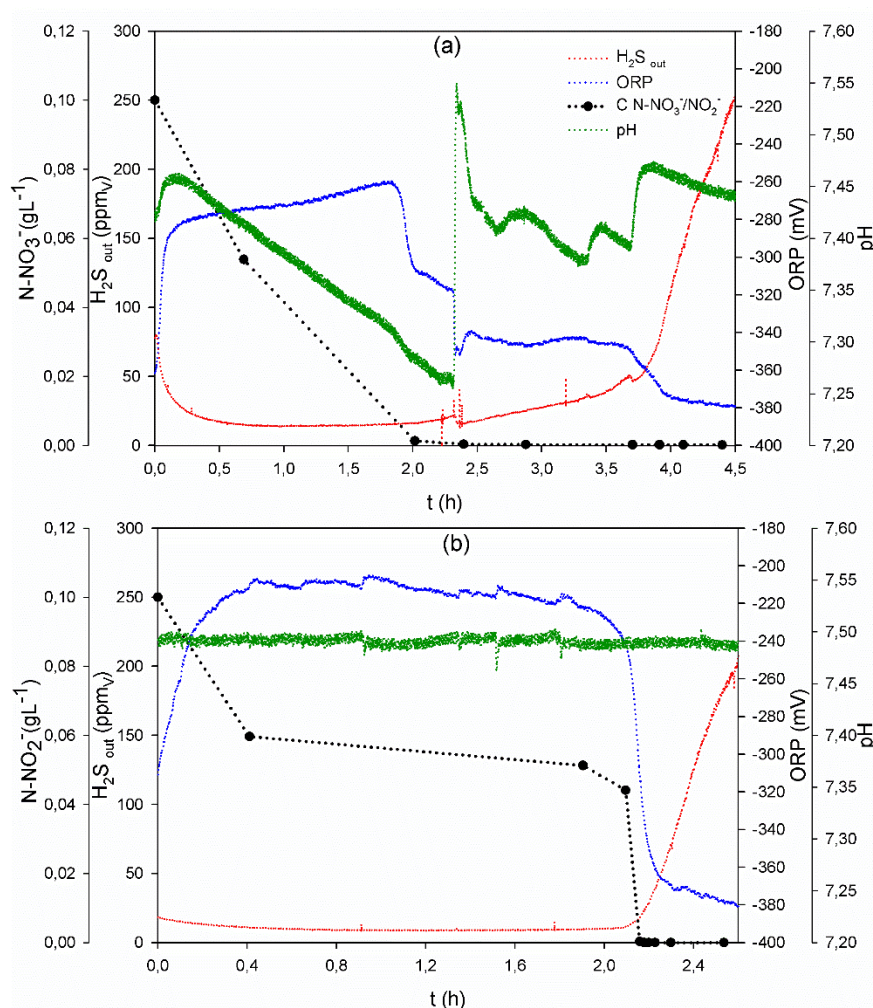


Figura 39. Barrido de ORP. (a) operación con nitrato, (b) operación con nitrito.

En nuestro estudio, los resultados experimentales para el control basado en ORP se muestran en las figuras 40 y 41. Se muestra un periodo de tiempo del experimento realizado, donde el valor de la carga de entrada de H_2S fue de $40 \text{ gS-H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y para dos valores de *set point* diferentes.

El primer *set point* estudiado fue -340 mV (Fig. 40) permitió controlar la concentración de H_2S de salida en torno a un valor medio de 20 ppmv y 14 ppmv para la operación con nitrato (Fig. 40a), y la desulfuración con nitrito (Fig. 40b) respectivamente. Por otro lado, debido al agotamiento del aceptor de electrones, los picos de concentración máxima de salida de H_2S alcanzaron 50 y 20 ppmv empleando nitrato y nitrito respectivamente.

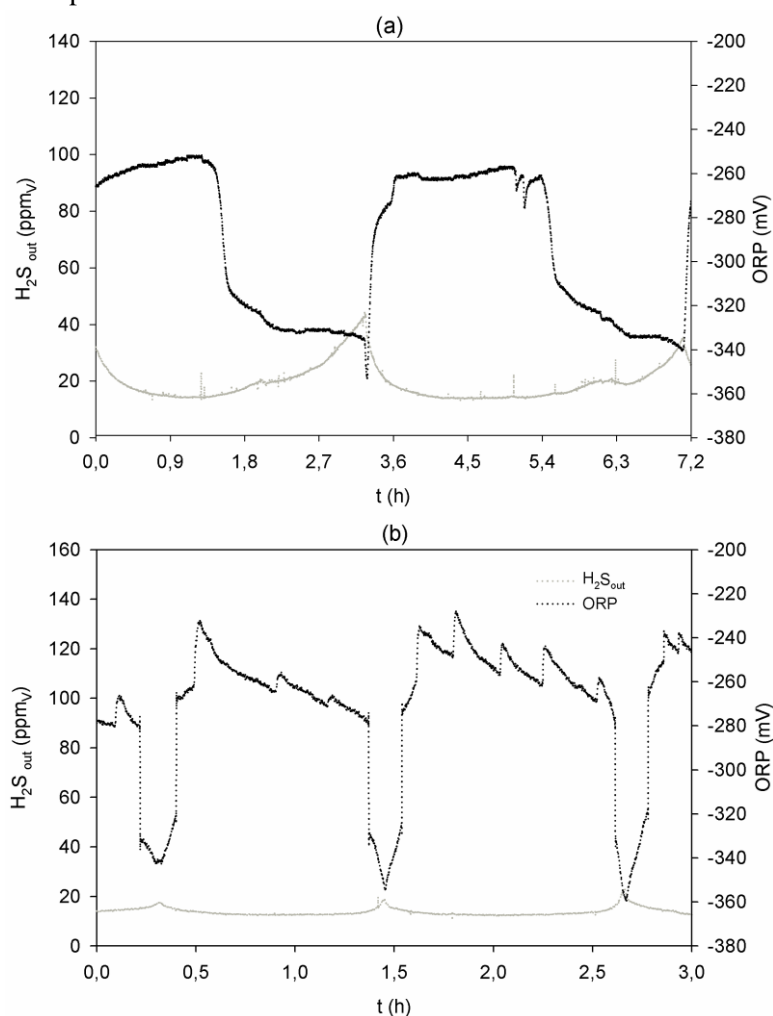


Figura 40. Control por ORP para set point de -340 mV. (a) operación con nitrato, (b) operación con nitrito.

Para el *set point* inferior (-360 mV, Fig. 41), se observó un aumento en la concentración de H₂S de salida mucho antes de que se alcanzara el punto de consigna, tanto en el experimento con nitrato (Fig. 41a), como en el estudio llevado a cabo con nitrito (Fig. 41b). Este comportamiento fue causado por el agotamiento del aceptor de electrones y la subsiguiente acumulación de sulfuro en el medio líquido, siendo mucho más rápido cuando se trabajó con nitrito. Otro aspecto a destacar es la variación que se produjo en el registro del ORP (Fig. 40-41), producto de la acción del control de pH del sistema, siendo mucho más visibles en la operación con nitrito.

Los estudios llevados a cabo previamente utilizaron métodos de dosificación del aceptor de electrones de tipo manual, programado y automatizado (Almenglo *et al.*, 2016; Fernández *et al.*, 2013). Y cabe destacar, que todos estos trabajos se llevaron a cabo empleando nitrato, por lo que, hasta la fecha, no existen estudios sobre el uso de sistemas similares en BTFs que trabajan con nitrito.

Respecto a los otros modos de dosificación de nitrato, aunque han sido empleados a escala de laboratorio, la dosificación manual no es factible para aplicaciones industriales debido a que requiere una inversión de tiempo elevado, altos niveles de nitrato y aumenta el riesgo de agotamiento de nitrato, causando altas concentraciones de salida de H₂S y efectos adversos sobre la biomasa (Sublette y Sylvester, 1987). Mientras que la alimentación programada de nitrato sería factible sólo cuando no se producen cambios en la carga de entrada de H₂S debido a que le es imposible responder a perturbaciones inesperadas de este parámetro, en cambio la dosificación automatizada por ORP, descrita por Almenglo *et al.* (2016) evita los efectos indeseados de las perturbaciones porque logra que exista una alta concentración de nitrato la mayor parte del tiempo en el BTF. Sin embargo, cuando se produce el agotamiento del aceptor de electrones, resulta inevitable evitar que la concentración de H₂S en la salida aumente y pueda tener repercusiones en procesos o usos posteriores del gas tratado. Aspecto este último que no fue una limitante, cuando el ORP se utilizó para el control de un ambiente limitante de oxígeno, en un biorreactor para la oxidación de sulfuro, en el estudio realizado por Janssen *et al.* (1998), quienes obtuvieron valores de ORP óptimos para la oxidación a azufre elemental entre -147 y -137 mV.

A modo de resumen, si comparamos los resultados obtenidos en el control por ORP, con los obtenidos empleando controladores PID, este último sistema fue capaz de superar las principales desventajas esbozadas anteriormente, como evitar los períodos de operación sin disponibilidad del aceptor de electrones y mantener la concentración de H_2S de salida estable frente a perturbaciones de carga de entrada de H_2S . Y si se compara con el modo de control anticipado, es posible afirmar que ambos métodos evitaron picos excesivamente altos de concentración de H_2S de salida.

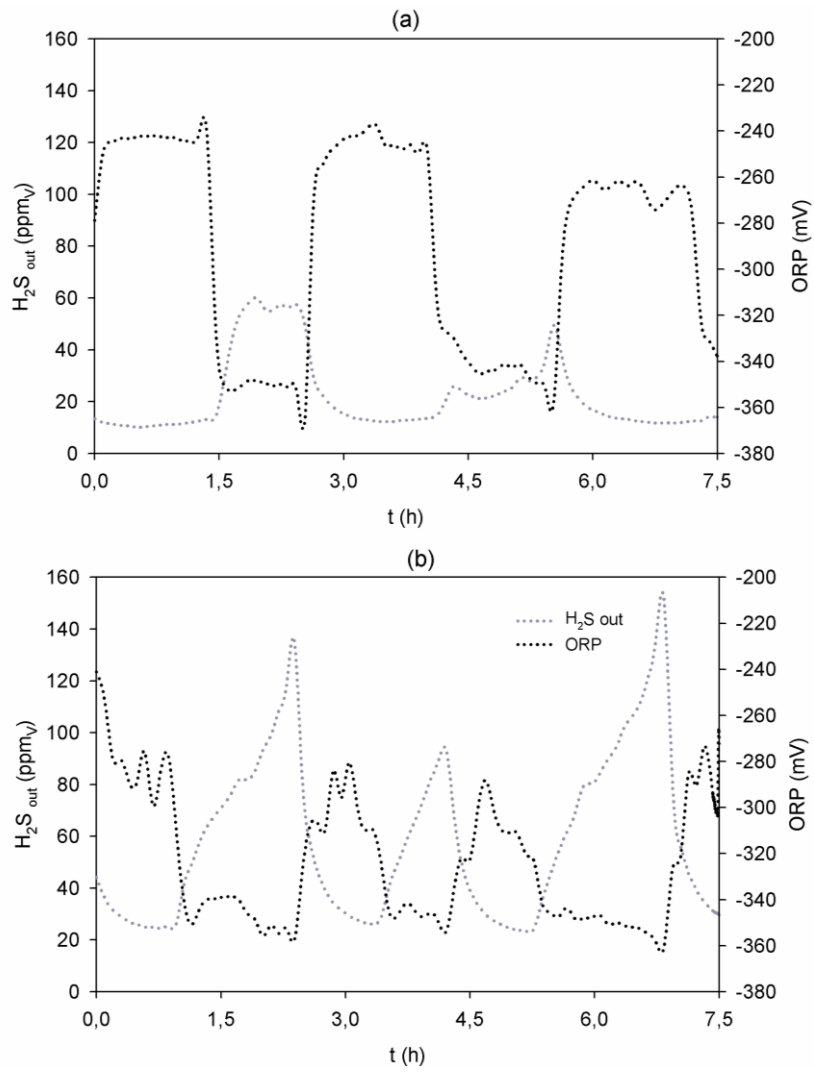


Figura 41. Control por ORP para set point de -360 mV. (a) operación con nitrato, (b) operación con nitrito.

4.5 Respuesta del sistema de control ante cambios del tiempo de residencia.

Para el estudio de la influencia del EBRT en el sistema de control fueron estudiados tres valores (117, 92 y 67 s) (Fig. 42), los cuales son inferiores a los empleados en estudios de sistemas anóxicos similares que emplearon nitrato (Soreanu *et al.*, 2009; Almenglo *et al.*, 2016; Soreanu *et al.*, 2008b). El trabajo experimental fue llevado a cabo solo con el BTF operando con nitrito, con un controlador PI y *set point* de 15 ppm_v.

Para la variación de la concentración de H₂S de entrada estudiada (180-1000 ppm_v), mediante la función seno (Apartado 3.5 Fig. 9e), el controlador PI fue capaz de ajustar de manera satisfactoria la variable de control al *set point* establecido (15 ppm_v) para el tiempo de residencia de 117 s en el rango de IL estudiado (7-39 gS-H₂S m⁻³ h⁻¹). Para el experimento llevado a cabo a 92 s (IL: 9-50 gS-H₂S m⁻³ h⁻¹), fue observado un 7 % de desviación de la variable de control (16,2±0,6 ppm_v) respecto al *set point* establecido y en el caso de la operación al EBRT inferior (67 s), el ajuste de la concentración de H₂S de salida se desplazó hasta 14±1 ppm_v (Fig. 42a) para el estudio de cargas de entrada de H₂S entre 12-69 gS-H₂S m⁻³ h⁻¹. Para los tres EBRT estudiados la baja concentración de salida de H₂S, permitiría otros usos del biogás tratado, que podría ser alimentado, por ejemplo, a pilas tipo SOFC (Papurello *et al.*, 2014).

La variación del caudal de dosificación de nitrito, para cada EBRT estudiado se observa en la figura 42b. Los resultados obtenidos para el EBRT de 117 s, mostraron una variación del caudal entre 0,20-0,42 L h⁻¹, lo cual significa una variación de la carga de entrada entre 0,09-0,19 g N-NO₂⁻ h⁻¹. Si realizamos el mismo análisis para el EBRT de 92s, el caudal estuvo entre 0,28-0,68 L h⁻¹, correspondiente a una carga de nitrito de 0,12-0,32 g N-NO₂⁻ h⁻¹, y para el último EBRT de estudio, 67 s los resultados de la variación de caudal fue de 0,31-1,05 L h⁻¹ y la variación de la carga de 0,14-0,48 g N-NO₂⁻ h⁻¹. La diferencia más significativa en la variable manipulada tuvo lugar en zona ascendente del perfil de concentración de entrada de H₂S estudiado, llegando a ser su valor al EBTR más bajo (67 s) de hasta 1,5 veces el registrado a 117 s, en cambio en los valores inferiores

de la concentración de entrada de H_2S , se produjo una variación del 55 % entre ambos EBRT.

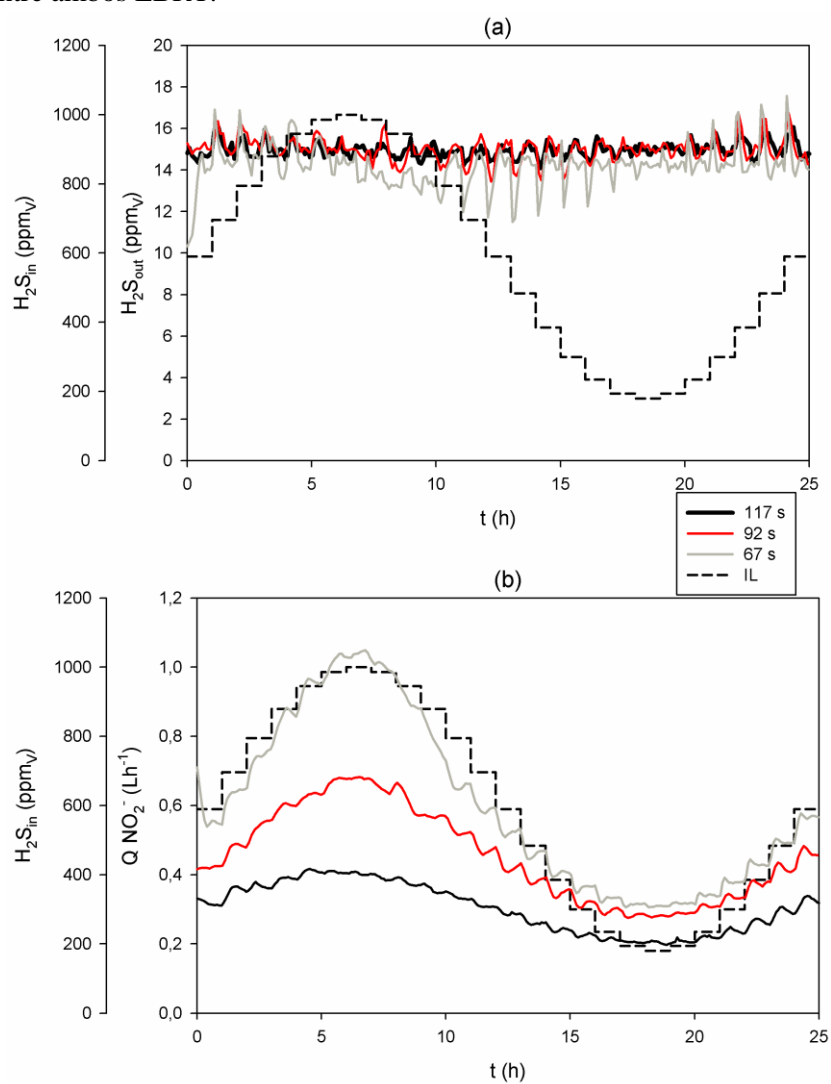


Figura 42. Cambios de EBRT. (a) perfil de H_2S_{out} . (b) perfil del caudal de nitrito.

Ante la disminución del EBRT y el aumento de la concentración de entrada de H_2S estudiados, el sistema alcanzó altos porcentajes de

eliminación (94,0-96,5%), favorecido por el efecto de ambos parámetros en el porcentaje de eliminación (Chung *et al.*, 2004; Namini *et al.*, 2008).

Los resultados satisfactorios alcanzados con los controladores PI y PID, desde el punto de vista de controlabilidad del sistema, validan la etapa de ajuste y selección de los mismos, teniendo en cuenta que de un correcto ajuste depende en gran medida, que el sistema de control logre los objetivos para los que ha sido diseñado. En la práctica, aproximadamente el 30% de los sistemas de control que son ineficientes es debido a un ajuste incorrecto del regulador a nivel industrial (Leva *et al.*, 2002).

4.6 Estudio de la dinámica poblacional durante los cambios del aceptor de electrones.

4.6.1 Estudio microbiológico de las poblaciones.

La figura 43, muestra el dendrograma y el gel DGGE realizado para las muestras tomadas en el lecho inferior del BTF, durante el periodo I.

El carril 0-I, corresponde a la muestra inicial antes de comenzar el periodo en sí, tras 286 días de operación con nitrato, las muestras 2-I a 10-I fueron tomadas cada 48 h, la muestra 14-I tras 96 h y finalmente la muestra 84-I, tomada 100 días después de la muestra inicial (0-I) y después de 84 días de operación con nitrito. Además, han sido incluidas las muestras de los cultivos puros *Thiobacillus denitrificans* DSM 12475 (*T.d.*) y *Sedimenticola selenatireducens* DSM 17993 (*S.s.*).

A partir de la intensidad normalizada de los valores de banda, se obtuvo un dendrograma de comparación (Fig. 43a) de los perfiles de bandas obtenidas para cada muestra. A partir de esta información se pudo apreciar la similitud entre las muestras 4-I, 6-I y 8-I, las cuales

corresponden a la etapa intermedia del periodo I, donde la carga de nitrato ha disminuido (84 al 54%) y el nitrito ha aumentado (18 al 45%). Otro cambio significativo en la comunidad se produjo entre las muestras 10-I y 14-I correspondientes a un incremento notable de la carga de nitrito (hasta 86%). Después de 70 días de haber concluido el cambio de nitrato a nitrito, se observó la mayor diferencia entre las muestras analizadas, específicamente entre la muestra correspondiente a este momento (84-I) y la muestra inicial 0-I.

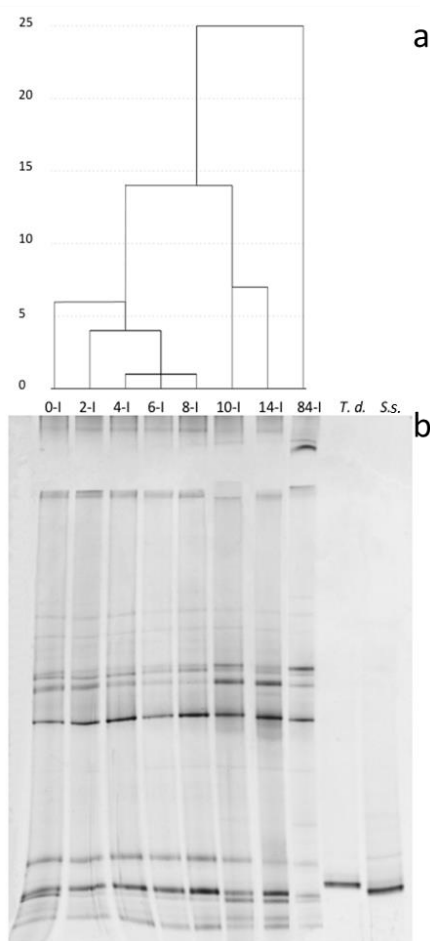


Figura 43. DGGE para muestras del periodo I. (a) dendograma, (b) DGGE.

Un análisis más profundo de la estructura de la comunidad puede ser llevado a cabo mediante el cálculo del índice de diversidad de Shannon-Wiener (H) y el índice de dominancia de Simpson (S). Estos indicadores son calculados sobre la base del número e intensidades relativas de las bandas de cada carril del gel (Fig. 44). Ambos índices son parámetros antagónicos y su interpretación responde a que cuando la comunidad es muy diversa (un mayor número de filotipos junto con un alto número relativo de individuos), la dominancia es baja (un bajo número de filotipos que son significativamente más representativos con respecto al resto de filotipos) (Gray, 2000).

A partir de esta información, es posible afirmar que se produjeron cambios, tanto en la biodiversidad como en la dominancia de las poblaciones, producto del cambio de nitrato a nitrito. En la etapa inicial del experimento (0-I), se registró la mayor diversidad microbiana ($H = 3,7$) asociada con la menor concentración de dominancia ($S = 0,09$). Por el contrario, la muestra 84-I exhibió el índice de diversidad más bajo ($H = 2,86$) y uno de los índices de dominancia más altos calculados entre las muestras analizadas ($S = 0,158$). Por otro lado, las muestras pertenecientes al periodo intermedio del cambio de aceptor de electrones (0-I y 14-I), mostraron niveles intermedios de diversidad (2,86-3,7) y valores de dominancia superiores a 0,094.

Según estos resultados, se pudo deducir que en la operación a largo plazo con nitrato del BTF (286 días, muestra 0-I), la diversidad microbiana fue significativamente mayor que la obtenida durante el cambio a nitrito. Además, la dominancia de las poblaciones fluctuó en la etapa intermedia del cambio realizado en el periodo I (desde 2-I hasta 14-I) hasta alcanzar una fase estacionaria sin cambios significativos en la comunidad, correspondiente a la operación a largo plazo con nitrito para la oxidación de H_2S (84-I).

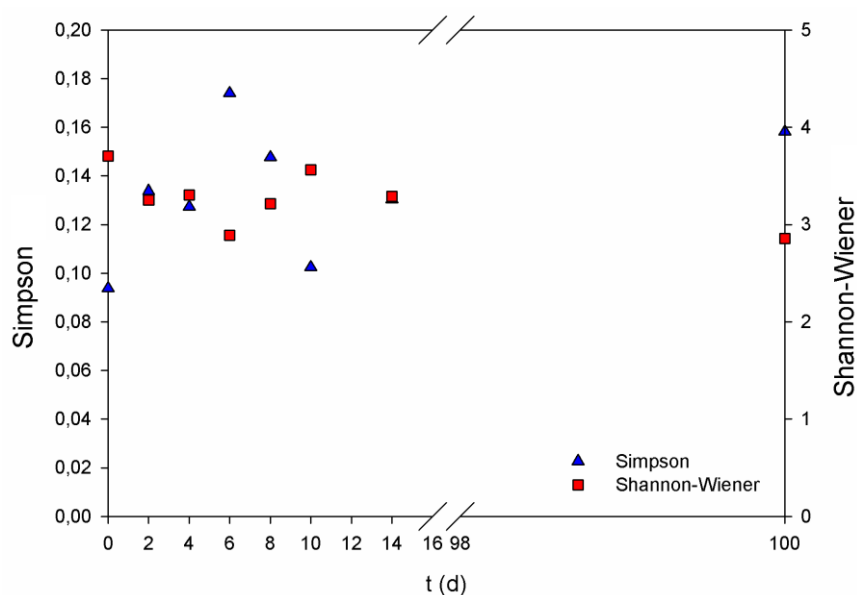


Figura 44. Índices de Simpson y Shannon-Wiener para muestras del periodo I.

Cabe señalar que no fueron observadas bandas correspondientes a *Thiobacillus denitrificans*, coincidiendo con los resultados observados por Fernández *et al.* (2013) en un BTF anóxico similar con nitrato. Sin embargo, en todas las muestras (de 0-I a 84-I), fue detectada la presencia de bandas con la misma movilidad electroforética en el gel (Fig. 43b), que se corresponden con la banda de PCR de *Sedimenticola selenatireducens*. Estos resultados se corresponden con los resultados expuestos por Flood *et al.* (2015), que demuestran que el género *Sedimenticola* sp. es capaz de realizar la oxidación de H_2S y azufre elemental en condiciones anaerobias con nitrato como aceptor de electrones, y que es capaz de crecer también en presencia de nitrito. Recientemente se ha detectado, y cabe resaltar su presencia, en el consorcio microbiano de un BTF anóxico con nitrato a escala piloto (Almenglo *et al.*, 2016), inoculado a partir de aguas residuales similares a las que han sido empleadas como inóculo en esta tesis, donde *Sedimenticola selenatireducens* presentó la mayor abundancia relativa (50%) de entre todas las especies identificadas.

La intensidad de las bandas de PCR de *Sedimenticola selenatireducens*, presentó cambios muy ligeros durante el periodo I, sin

embargo, tras 70 días de operación solamente con nitrito como aceptor de electrones (84-I), la intensidad disminuyó significativamente. Es de suponer, que, en el sistema en estudio, la presencia de *Sedimenticola* sp., puede tener un papel importante en la oxidación de H₂S en la operación con nitrato durante el periodo I, pero la disminución de la abundancia de este filotipo (84-I), hace pensar que su papel pasa a un segundo plano en la operación con nitrito.

Russ *et al.* (2014) han descrito como *Sedimenticola selenatireducens* asumió el papel de *Sulfurimonas denitrificans*, en la desnitrificación autotrófica utilizando nitrato como aceptor final de electrones. Estos autores observaron que la cantidad inicial de *Sulfurimonas denitrificans*, se redujo hasta el 0,09%, sin embargo, la actividad sulfuro-oxidante se mantuvo, detectándose la presencia dominante de *Sedimenticola selenatireducens* (43,9%). Estos resultados podrían indicar que, tras el cambio a nitrito, el papel de *Sedimenticola selenatireducens* podría verse reemplazado progresivamente por otras unidades taxonómicas operativas (OTU) o filotipos con el aumento de dominancia en la operación a largo plazo con nitrito (84-I) (Fig. 44). Por otro lado, no parece que las OTU que estén menos representadas desaparezcan completamente del sistema. Lo cual podría indicar cierto grado de resiliencia del sistema una vez se restablezcan condiciones favorables para esas OTU latentes y versatilidad dependiendo del aceptor de electrones final usado.

Tras haber realizado el análisis del periodo I en profundidad, se procedió a realizar un segundo DGGE (Fig. 45), teniendo en cuenta muestras de los tres periodos de cambio de aceptor de electrones realizados (Tabla 25). Las muestras incluidas han sido: 0-I, corresponde al inicio del periodo I, tras 286 días de operación con nitrato, la muestra 84-I, tomada 100 días después de la muestra inicial (0-I), después de 84 días de operación con nitrito y en momento inicial del periodo II. Las muestras 2-II, 4-II y 6-II, tomadas cada 48 h durante el cambio de nitrito a nitrato (periodo II), la muestra 0-III que corresponde al inicio del periodo III tras 45 días de operación con nitrato, las muestras tomadas cada 48 h durante el periodo III (2-III, 4-III, 6-III) y las muestras tomadas 38 días después del último cambio de aceptor de electrones, correspondientes al lecho

inferior (I-III) y al lecho superior (S-III) del BTF. De igual manera que en la figura 43, fueron incluidos los cultivos puros de *T.d.* y *S.s.*

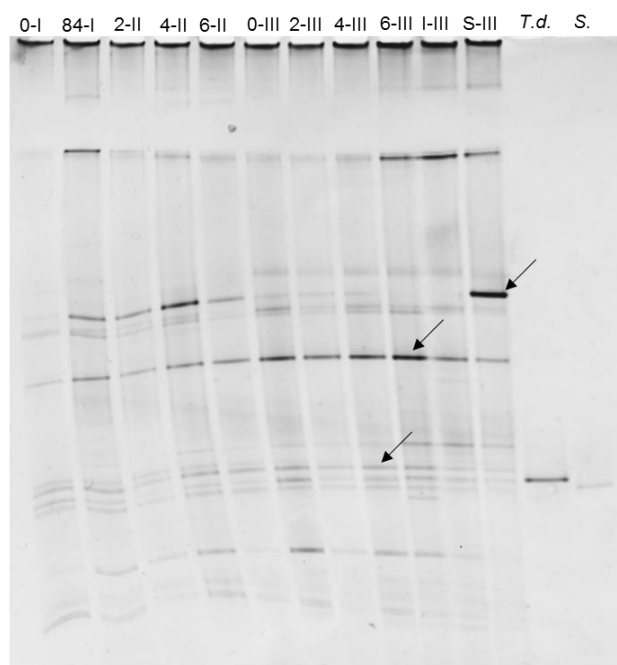


Figura 45. Gel DGGE con muestras de los tres periodos de cambio del aceptor de electrones realizados.

El dendograma realizado (Fig. 46) teniendo en cuenta la intensidad normalizada de los valores de banda de este gel, muestra dos grupos bien diferenciados entre sí. En el primero de estos grupos están las muestras tomadas tras largos periodos de operación con nitrito (2-II, 4-II, S-III, 84-I y 6-II), las cuales corresponden en su mayoría a las tomadas durante el periodo II. El otro grupo incluyó generalmente, las muestras tomadas en momentos de operación con nitrato (2-III, 4-III, 0-III, 6-III, I-III), durante el periodo III. Los resultados correspondientes a las muestras del lecho inferior y superior indican que en la parte superior del BTF se producen más rápido los cambios en la estructura de la comunidad que en la parte inferior, coincidiendo con la entrada al BTF de las fases líquidas y

gaseosas, la zona con mayor concentración de sustrato y aceptor de electrones (Song *et al.*, 2000).

Tabla 25 Muestras incluidas en el DGGE de los periodos I, II y III.

Muestra	t (d)*	Aceptor de electrones	N-NO ₃ ⁻ /N _{total} (%)	N-NO ₂ ⁻ /N _{total} (%)
0-I	285	NO ₃ ⁻	100	0
84-I	385		0	100
2-II	387	NO ₂ ⁻ / NO ₃ ⁻	28	72
4-II	389		64	36
6-II	391		100	0
0-III	436		100	0
2-III	438	NO ₃ ⁻ / NO ₂ ⁻	59	41
4-III	440		35	65
6-III	442		0	100
I-III	480	NO ₂ ⁻	0	100
S-III	480		0	100

* tiempo desde la inoculación.

Tras el cambio a nitrito (periodo III), la muestra perteneciente a la zona inferior del BTF (I-III) presentó mayor similitud en cuanto al perfil de bandas comparadas con las muestras tomadas en las condiciones previas (periodo II). Por otro lado, tras los sucesivos cambios entre los aceptores de electrones, el resultado para la muestra inicial (0-I), indicó que es notablemente diferente a todas las demás, por lo que la estructura de la comunidad ha variado hasta el punto de diferenciarse significativamente con respecto a la comunidad en las condiciones iniciales de este estudio, por lo cual parece ser que el sistema no es del todo reversible, al menos a corto plazo de operación.

Los resultados de los índices de Simpson y Shanon-Weiner (Fig. 47) muestran cambios similares entre la diversidad (2,58-2,97) y dominancia (0,18-0,21) de filotipos durante los cambios de aceptor de electrones (periodos I, II y III), con excepción de las muestras 2-II, 2-III, I-III y S-III, las cuales corresponden a períodos que marcan caídas en la diversidad microbiana, con valores del índice de H entre 2,1-2,5 y los mayores índices de dominancia de los filotipos presentes (S=0,25-0,34).

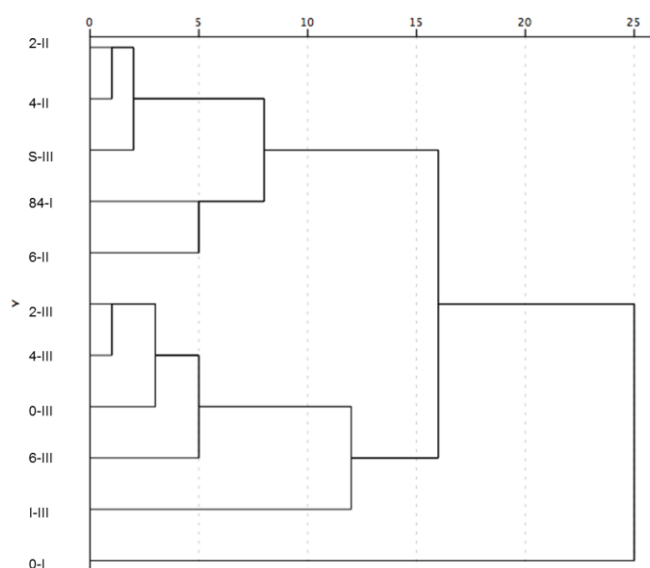


Figura 46. Dendrograma de resultados del gel DGGE para periodos I, II y III.

Los resultados específicos de las muestras correspondientes a la zona inferior (I-III) y superior (S-III), indican que en la zona superior del BTF existe una ligera disminución de la diversidad ($H=2,4$) con respecto a la zona inferior ($H=2,11$). La menor dominancia en la región inferior ($S=0,28$) respecto a la zona superior ($S=0,34$), puede ser consecuencia de OTU que permanezcan latentes entre los cambios de aceptor de electrones.

Los resultados analizados anteriormente sugieren que se ha llevado a cabo un proceso de selección de poblaciones favorecido por el cambio del aceptor de electrones, aunque las poblaciones latentes permanecen durante el período experimental, provocando que haya cierta similitud en el consorcio independientemente del aceptor de electrones que ha sido empleado. En ese caso, estos resultados coinciden con el estudio realizado por Jing *et al.* (2010), de dos reactores sulfuro- oxidantes anaerobios, uno de ellos operando con nitrato y el otro con nitrito, y tras comparar los resultados de DGGE para muestras de cada reactor, sugirieron que las comunidades microbianas de ambos reactores eran similares.

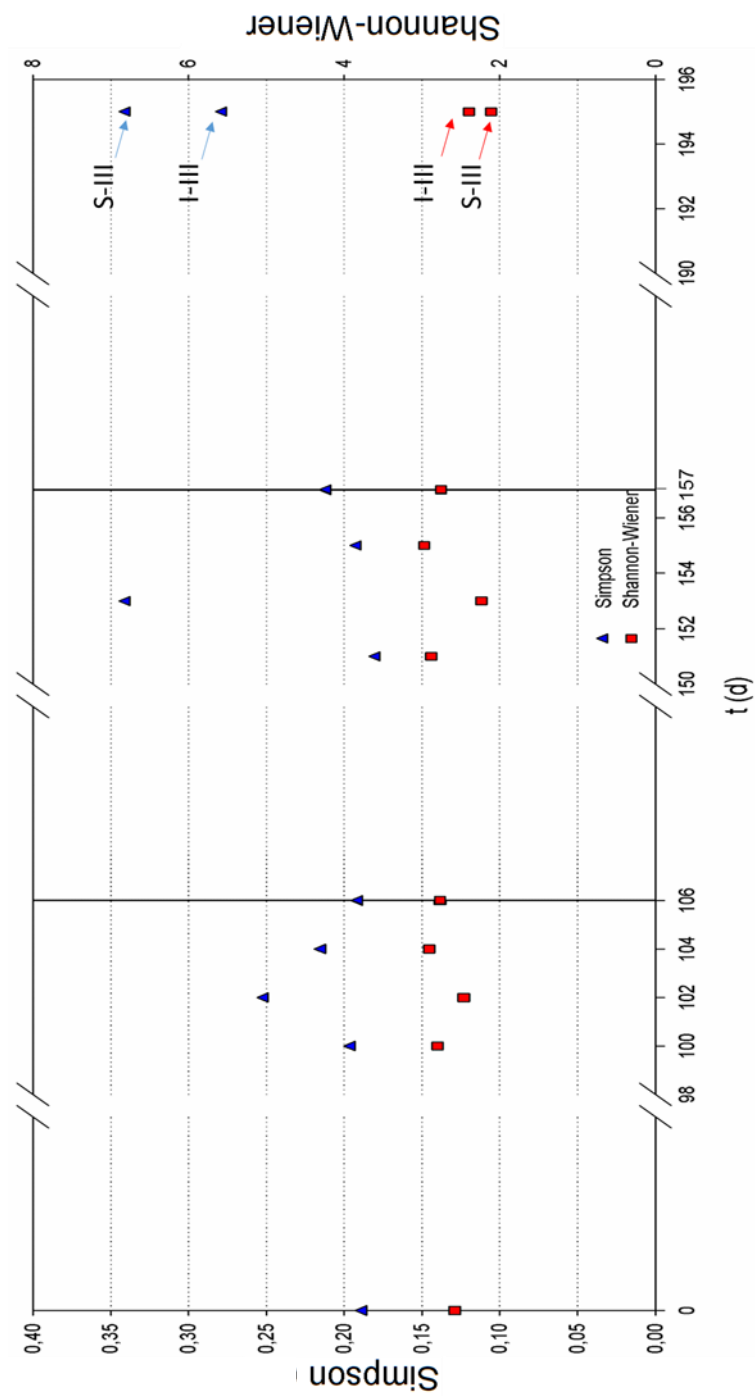


Figura 47. Índices de Simpson y Shannon-Wiener para muestras del periodo I, II y III.

4.6.2 Identificación de unidades taxonómicas operativas.

Hasta la fecha han sido secuenciadas las bandas marcadas en la figura 45, correspondientes a las muestras: S-III, 6-III y 4-III. Tras la secuenciación, la secuencia del gen 16S rRNA de cada una de las bandas fue comparada en la base de datos Nucleotide Blast® (16S ribosomal RNA sequences) (Bacteria and Archaea) (Zhang *et al.*, 2000).

La banda de la muestra S-III fue la que mayor intensidad presentó en el gel DGGE (Fig.46). Entre los taxones con mayor grado de homología para la secuencia FASTA de esta banda (Anexo 10), se encontraron:

Con el mayor grado de homología la cepa *Sulfurimonas denitrificans* DSM 1251 (96%) (Sievert *et al.*, 2008). Para esta cepa, que anteriormente fue clasificada como *Thiomicrospira denitrificans* ATCC 33889 (Takai *et al.*, 2006), se ha descrito que obtiene energía mediante la oxidación de compuestos reducidos de azufre, entre los que se encuentra el H₂S. Entre los aceptores de electrones que puede utilizar se encuentran el O₂ y el NO₃⁻ (Kelly y Wood, 2006), lo cual le infiere un papel importante en los ecosistemas donde esté presente tanto en el ciclo del nitrógeno como en la transformación del azufre (Sievert *et al.*, 2008). Con un 93 % de homología, la cepa *Sulfurimonas paralvinellae* GO25. Descrita como quimiolitótrofa anaeróbica facultativa, capaz de crecer utilizando azufre elemental o tiosulfato como fuente de energía (Takai *et al.*, 2006). Y con un 92% de homología la cepa *Sulfurimonas autotrophica* OK10, que también posee actividad sulfuro-oxidante (Sikorski *et al.*, 2010).

En cambio, en la comparación de la secuencia FASTA de la banda analizada de la muestra 6-III (Anexo 11), se encontraron, entre los mayores grados de homología, bacterias del phylum *Bacteroidetes*:

Con un 91% de homología, fueron bacterias del género *Flexibacter* (*Solitalea koreensis* R2A36-4), que pueden presentar actividad nitrato-reductora (Weon *et al.*, 2009). Así como con las cepas *Solitalea canadensis* DSM 3403 y NBRC 15130, ambas con igual grado de homología (91%).

Para la otra banda secuenciada, perteneciente a la muestra 4-III (Anexo 12), la mayor homología correspondió con el phylum *Proteobacteria*, con actividad sulfato-reductora previamente descrita. Como es el caso de un 96% de grado de homología con la identidad de la cepa *Desulfofustis glycolicus* PerGlys, o el 95% respecto a la cepa

Desulforhopalus singaporensis S`pore (Friedrich *et al.*, 1996, Lie *et al.*, 1999).

Todas las bandas secuenciadas tienen una identidad similar a bacterias de los phyla *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*. Estos phyla han sido identificados en procesos de oxidación de sulfuro por vía de la desnitrificación (Almenglo *et al.*, 2016a; Jing *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2015). Los cuales parecen estar bien representados en el BTF para desulfuración anóxica, que ha sido estudiado en esta tesis.

CONCLUSIONES

Arranque del BTF.

Altos porcentajes de eliminación de H_2S (95%), fueron alcanzados durante la etapa de inoculación, empleando un método de dosificación de nitrato por ORP, así como una concentración de biomasa de $9,1 \pm 0,4 \times 10^9$ células (g de soporte seco)⁻¹.

Cambios de aceptor de electrones.

Resulta viable la operación con nitrito como aceptor de electrones en un BTF anóxico.

El cambio sucesivo del aceptor de electrones, ha provocado cambios en la estructura de las poblaciones, sin que repercuta negativamente en la eficiencia del proceso de eliminación de H_2S .

Control anticipado.

La regulación de la concentración de nitrato y nitrito mediante una estrategia de control anticipado, permitió reducir, tanto los picos de concentración de H_2S como la masa emitida de H_2S en un 63% y en 26% respectivamente, respecto al sistema sin control. El sistema de control fue capaz de adaptarse al perfil de cargas de H_2S (28,1-141,1 gS- H_2S m³h⁻¹).

El control anticipado permite mantener de manera precisa la ratio $\text{N}:\text{S}_{\text{in}}$ de trabajo impuesta al sistema, manteniendo constante la selectividad de los productos de oxidación de H_2S .

Control retroalimentado.

Las técnicas complejas de ajuste de controladores (AMIGO y Ziegler-Nichols), así como el control retroalimentado sobre la concentración de salida de H_2S , han sido empleados satisfactoriamente en el sistema biológico que representa el BTF anóxico.

En la operación con nitrato y nitrito, un controlador tipo PID ha realizado una acción de control robusta ante perturbaciones de la carga de

entrada de H_2S . Una respuesta igual de efectiva fue observada ante cambios del set point de la variable de control entre 25-200 ppm_v.

En el estudio de EBRT, un controlador tipo PI proporcionó una acción de control suficiente para mantener porcentajes de eliminación de H_2S entre 94,0-96,5% para una concentración de H_2S máxima de entrada de 1000 ppm_v.

Microbiología de las poblaciones.

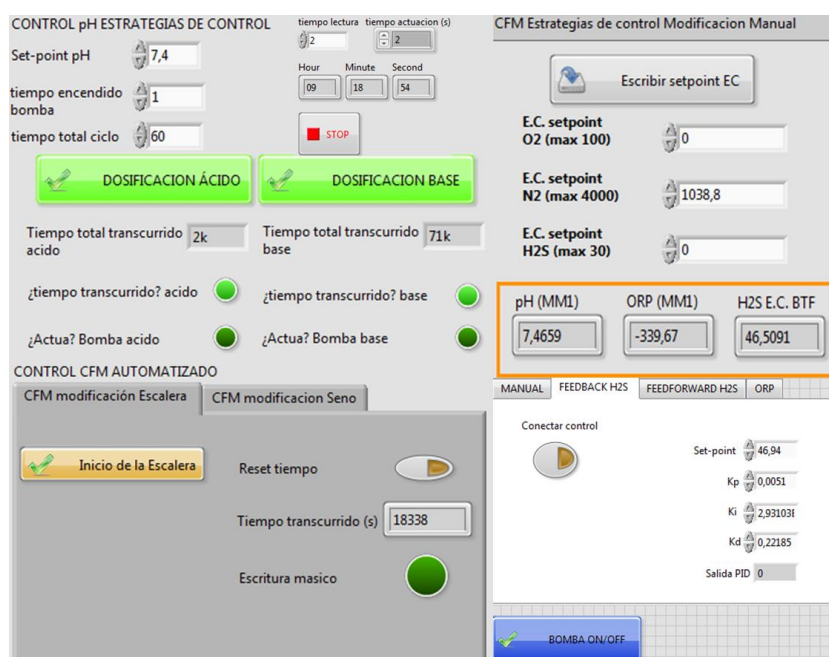
Ha sido detectada la presencia de bacteria del género *Sedimenticola* en muestras biológicas obtenidas del BTF tanto en la operación con nitrato como con nitrito.

Los cambios entre aceptores de electrones, han tenido efecto sobre la estructura de la comunidad de bacterias, desde el punto de vista de la diversidad y la dominancia de especies.

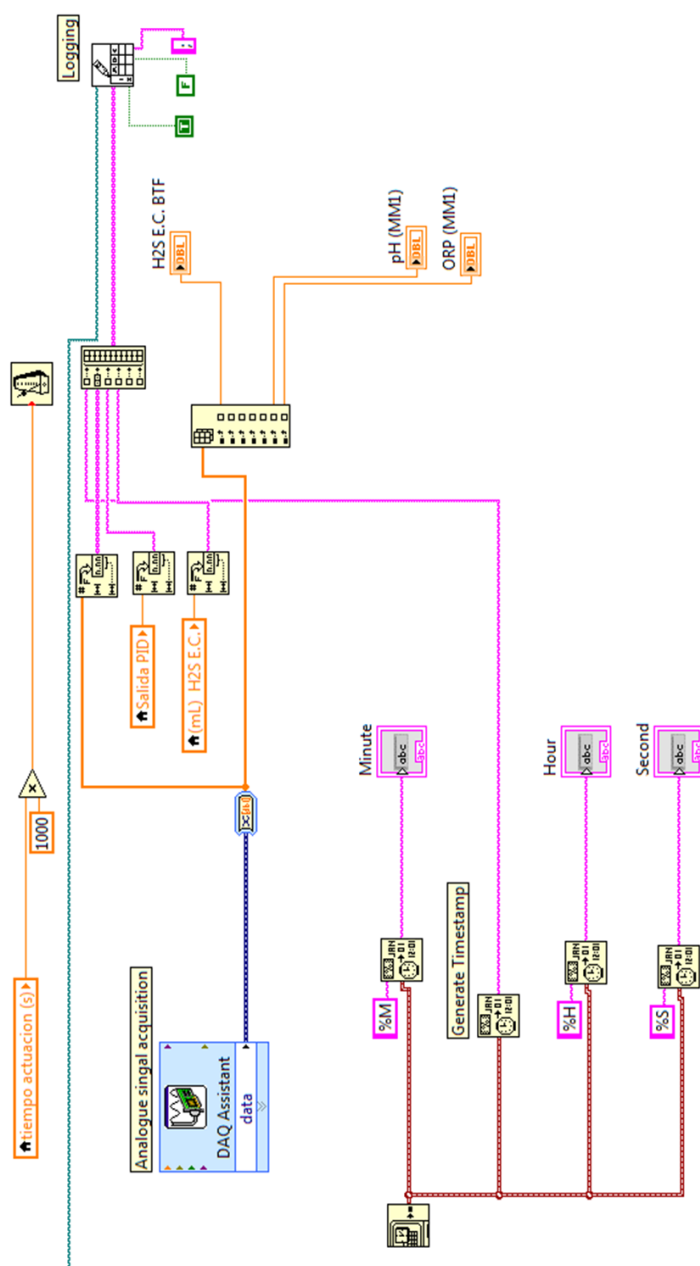
La secuenciación realizada de las bandas obtenidas en el DGGE, ha permitido identificar bacterias de los phyla *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*, con un alto grado de homología con secuencias del gen ARN ribosomal 16S de bacterias desnitrificantes y sulfuro-oxidantes, que han sido incluidas previamente en la base de datos Nucleotide Blast[®].

ANEXOS

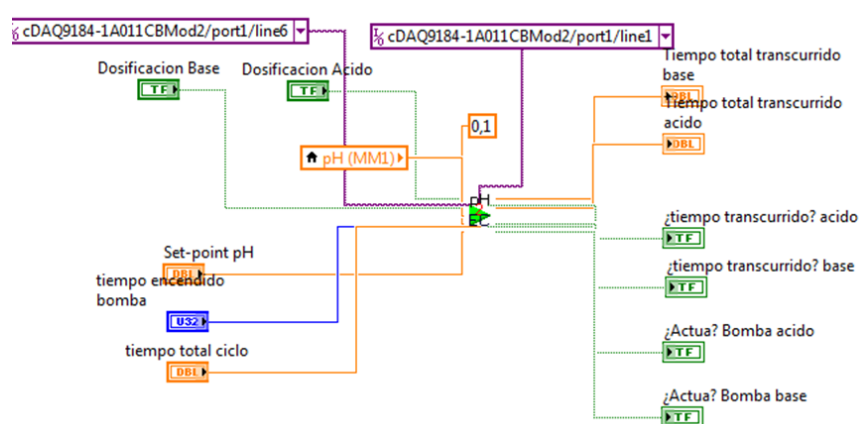
Anexo 1. Panel de control. Interfaz de usuario de LabVIEW®.



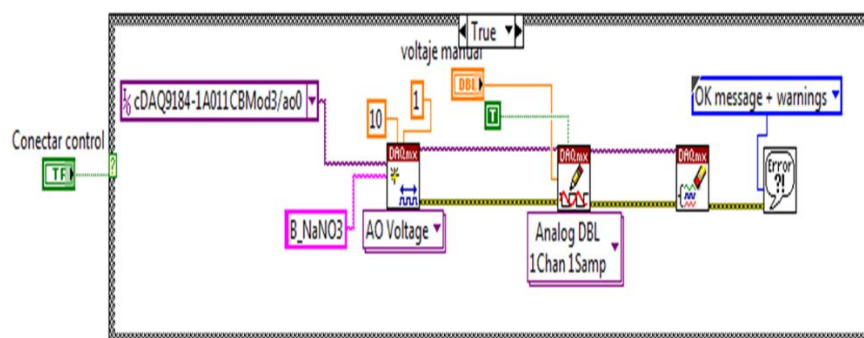
Anexo 2. Bloque de adquisición de datos.



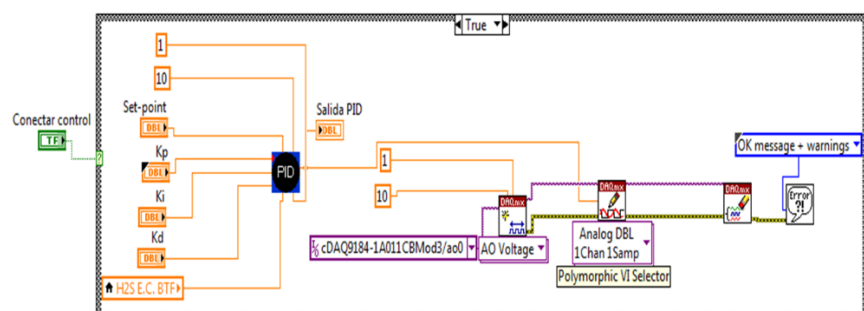
Anexo 3. Bloque de control de pH.



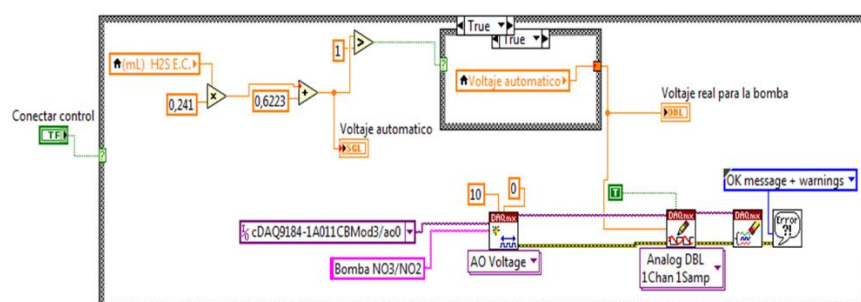
Anexo 4. Diagrama de bloques para la dosificación del aceptor de electrones. Control manual.



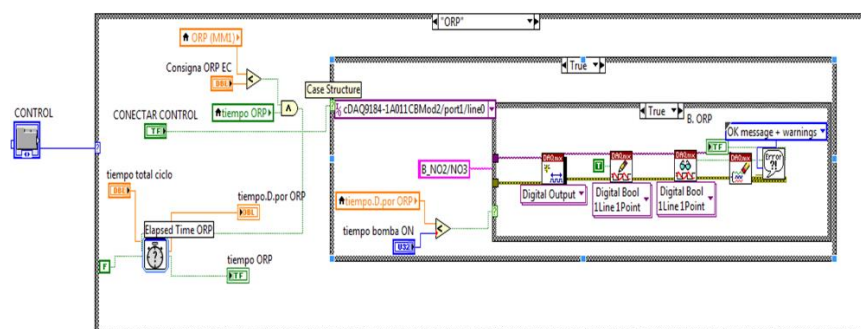
Anexo 5. Diagrama de bloques para la dosificación del aceptor de electrones. Control retroalimentado.



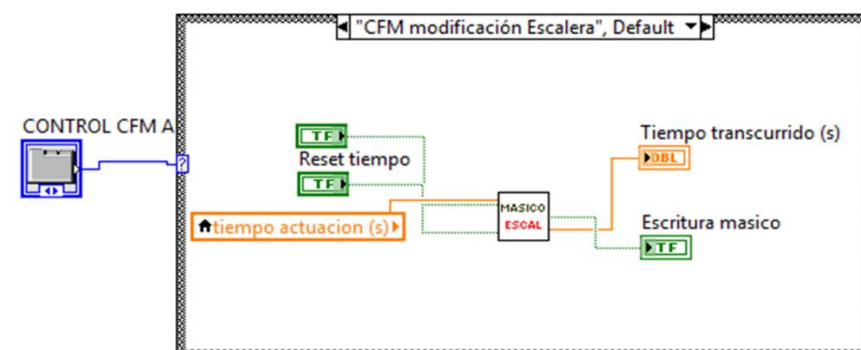
Anexo 6. Dosificación del aceptor de electrones. Control anticipado.



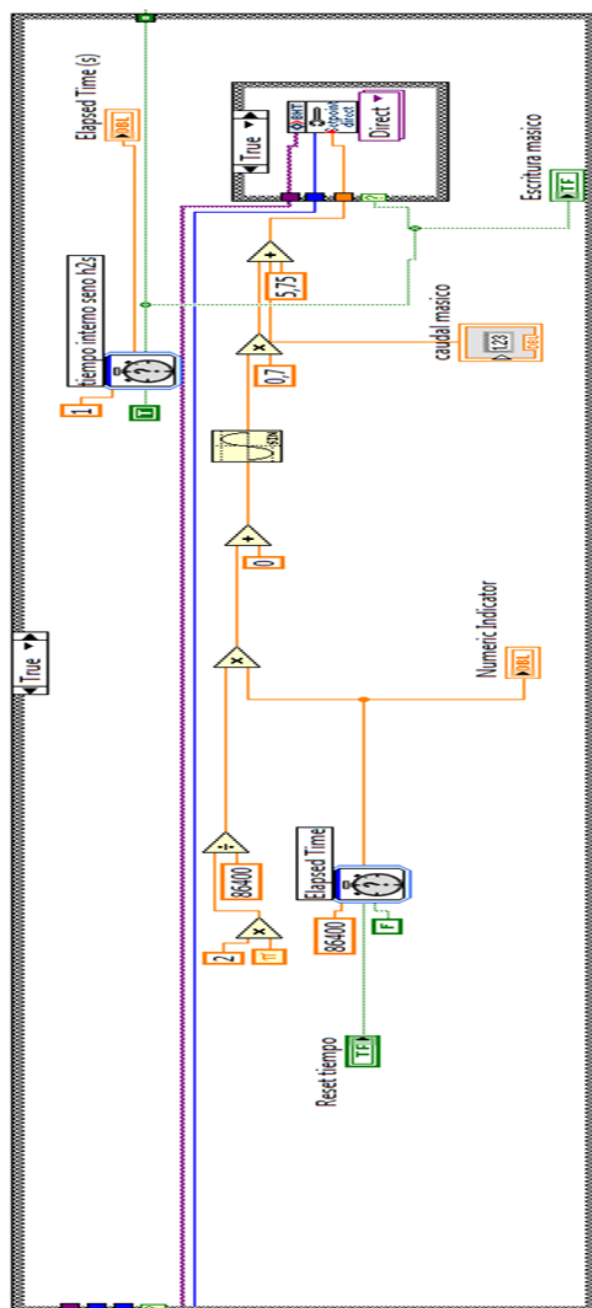
Anexo 7. Dosificación del aceptor de electrones. Control por ORP.



Anexo 8. Variación del másico de H₂S. Función escalera.



Anexo 9. Variación del másico de H₂S. Función escalera sinusoidal.



Anexo 10. Secuencia FASTA banda marcada en carril S-III (Fig. 46).

```
GGGAACGCCGCGTGGAGGATGACGCATCTCGGTGTGTAACTC  
CTTTTATGAGTCAAGAACAATGACGGTAGCTCATGAA  
  
TAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGG  
GGGTGCAAGCGTTACTCGGAATCACTGGGCGTAAAGG  
  
ACGCGTAGGCTGGTTAGAAAGTCAGGTGTGAAAGCCTACAGCT  
CAACTGTAGAATTGCACTTGAAACTCCTAACCTAGAG
```

Anexo 11. Secuencia FASTA banda marcada en carril 6-III (Fig. 46).

```
CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGGTCAATGGACGCA  
AGTCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCAGGAAGACGGCCC  
  
TATGGGTTGTAACTGCTTTTGTTCAGGGAATAAACCCCGTAC  
GTGTACGGGGCTGAAGGTACCTGAAGAATAAGCATCG  
  
GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAA  
GCGTTATCCGGATTCAATTGGGTTTAAAGGGTGCGCAGG  
  
CGGATTGGTAAGTCAGGGGTGAAATCCCACAGCTCAACTGTGG  
AACTGCCTTTGATACTGCCAGTCTTGAGTATAGTTGA  
  
AGTGGGCGGAATGTGTTCATGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATG  
ACACAGAACACCGATCGCGAAGGCAGCTCGCTAAGCT  
  
ATAACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGA  
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATTA  
  
CTCGATGTTGGCGATATACAGTCAGCGTCTGAGCGAAAGCAAT  
AAGTAATCCACCTGGGGAGTACGATCGCAAGATTGAA  
  
ACTCAAAGGAATTGACGG
```

Anexo 12. Secuencia FASTA banda marcada en carril 4-III (Fig. 46).

```
GGGCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGCGCAATGGGG  
GCAACCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGATGATGAAGG  
  
CCTTCGGGTTGTAAATCCTGTTCAGATGGGAAGAACGGTAGGA  
GGGTTAACAGCCCTGTTATTTGACGGTACCATCAAAG  
  
GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGG  
AGGGTGCAAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGC
```


GCGCGTAGGCGGCTCTTTAAGTCATTTGTGAAAGTCCACGGCT
CAACTGTGGAAGTGCATGTGAACTGGAGAGCTTGAG
TACTGGAGGGGGTGGTGAATTCCCGGTGTAGAGGTGAAATTC
GTAGATATCGGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGACC
ACCTGGCCAGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
CGATGTCAACTAGGCGTTGGGATGGTTAATCGTCTCATTGCCG
CAGCAAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGG
TCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGG

Anexo 13. Artículo publicado.

REFERENCIAS

- A.** Leva, C. Cox, and A.R., 2003. Hands-on PID autotuning: a guide to better utilization, in: IFAC professional brief: p 1–84.
- A. Wellinger, A.L., 1999. Biogas upgrading and utilization. Task 24: energy from biological conversion of organic wastes. IEA Bioenergy: p 1–19.
- Abatzoglou, N. and Boivin, S., 2009. A review of biogas purification processes. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* **3**: p 42–71.
- Aguilar, R., Poznyak, A., Martínez-Guerra, R. and Maya-Yescas, R., 2002. Temperature control in catalytic cracking reactors via a robust PID controller. *J. Process Control* **12**: p 695–705.
- Aguilera, P.G. and Gutiérrez Ortiz F.J., 2016. Techno-economic assessment of biogas plant upgrading by adsorption of hydrogen sulfide on treated sewage–sludge. *Energy Convers. Manag* **126**: p 411–420.
- Ahn, J., Daidou, T., Tsuneda, S. and Hirata, A., 2002. Characterization of denitrifying phosphate-accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis assay. *Water Res.* **36**: p 403–412.
- Åkesson, M. and Hagander, P., 1999. Control of Dissolved Oxygen in Stirred Bioreactors, in: 14th World Congress of IFAC, Beijing, P.R. China: p 1–16.
- Al Seadi, T., Rutz, D., Prassl, H., Köttner, M., Finsterwalder, T., Volk, S., Janssen, R., Kulišić, B. and Kojaković, A., 2009. *Biogas Handbook*. University of Southern Denmark Esbjerg. Denmark.
- Allegue, L.B., Hinge, J. and Allé, K., 2012. Biogas and bio-syngas upgrading. Danish Technological Institute, Aarhus: p 1–97.
- Almenglo, F., Bezerra, T., Lafuente, J., Gabriel, D., Ramírez, M. and Cantero, D., 2016a. Effect of gas-liquid flow pattern and microbial diversity analysis of a pilot-scale biotrickling filter for anoxic biogas desulfurization. *Chemosphere* **157**: p 215–223.
- Almenglo, F., Ramírez, M., Gómez, J.M., Cantero, D., 2016b. Operational conditions for start-up and nitrate-feeding in an anoxic biotrickling filtration process at pilot scale. *Chem. Eng. J.* **285**: p 83–91.
- Almenglo, F., Ramírez, M., Gómez, J.M., Cantero, D., 2013. H₂S removal

- from biogas by a pilot anoxic biotrickling filter. A comparison between cocurrent and countercurrent flow operation mode increasing the loading rate., in: 5th IWA Specialized Conference on Odors and Air Emissions. 10th Conference on Biofiltration for Air Pollution Control. San Francisco, California, USA.
- Amend, J.P., Edwards, K. J. and Lyons, T.W. (Ed.), 2004. Sulfur Biogeochemistry: Past and Present. The Geological Society of America, Inc., Boulder, USA.
- Aroca, G., Urrutia, H., Núñez, D., Oyarzún, P., Arancibia, A. and Guerrero, K., 2007. Comparison on the removal of hydrogen sulfide in biotrickling filters inoculated with *Thiobacillus thioparus* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. Electron. J. Biotech. **10**: p 514–520.
- Åström, K.J., 2002. Control system design lecture notes for ME 155A. Department of Mechanical & Environmental Engineering. University of California Santa Barbara. USA
- Åström, K.J. and Hägglund, T., 1995. PID Controllers: Theory, Design, and Tuning. Instrument Society of America, Research Triangle Park, North Carolina. USA.
- Åström, K.J. and Hägglund, T., 2006. Advanced PID control. ISA-The Instrumentation, Systems, and Automation Society; Research Triangle Park, North Carolina. USA.
- Åström, K.J. and Hägglund, T., 2004. Revisiting the Ziegler–Nichols step response method for PID control. J. Process Control **14**: p 635–650.
- Awouda, A.E.A. and Mamat, R. Bin, 2010. New PID tuning rule using ITAE criteria. Int. J. Eng. **3**: p 597–608.
- B**agreev, A., Katikaneni, S., Parab, S. and Badosz, T.J., 2005. Desulfurization of digester gas: prediction of activated carbon bed performance at low concentrations of hydrogen sulfide. Catal. Today **99**: p 329–337.
- Bahr, M., Díaz, I., Dominguez, A., González Sánchez, A. and Muñoz, R., 2014. Microalgal-biotechnology as a platform for an integral biogas upgrading and nutrient removal from anaerobic effluents. Environ. Sci. Tech. **48**: 573–81.
- Bailon Allegue, L. and Hinge, J., 2014. Biogas upgrading Evaluation of methods for H₂S removal. Danish Technological Institute.

- Bandosz, T.J., 2002. On the adsorption/oxidation of hydrogen sulfide on activated carbons at ambient temperatures. *J. Colloid Interface Sci.* **246**: p 1–20.
- Baspinar, A.B., Turker, M., Hocalar, A. and Ozturk, I., 2011. Biogas desulphurization at technical scale by lithotrophic denitrification: Integration of sulphide and nitrogen removal. *Process Biochem.* **46**: p 916–922.
- Bessou, C., Ferchaud, F., Gabrielle, B. and Mary, B., 2011. Biofuels, greenhouse gases and climate change. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **31**: p 1–79.
- C**abrol, L. and Malhautier, L., 2011. Integrating microbial ecology in bioprocess understanding: the case of gas biofiltration. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* **90**: p 837–849.
- Cano, P., Brito, J., Almenglo, F., Ramirez, M., Gómez, J.M and Cantero, D., 2016. Simultaneous Ammonium Removal from Ammonium-Rich Water and Biogas Desulfurization, in: 1st International Conference on Bioenergy & Climate Change, Soria Spain.
- Cano, P. Colon, J., Ramirez, M., Lafuente, J., Gabriel, D., Cantero, D., 2016. Life Cycle Assessment of Biogas Desulfurization by Different Technologies to Valorize the Biogas Potential Energy in Sewage Plants, in: 1st International Conference on Bioenergy & Climate Change, Soria Spain.
- Cardoso, R.B., Sierra-Alvarez, R., Rowlette, P., Flores, E.R., Gómez, J. and Field, J.A., 2006. Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **95**: p 1148–1157.
- Carrera, J., Vicent, T. and Lafuente, J., 2004. Effect of influent COD/N ratio on biological nitrogen removal (BNR) from high-strength ammonium industrial wastewater. *Process Biochem.* **39**: p 2035–2041.
- Cees, B.J.N., 1990. Optimization of sulphur production in a biotechnological sulphide-removing reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: p 50–56.
- Cervin, A., Eker, J., Bernhardsson, B. and Årzén, K.-E., 2002. Feedback–feedforward scheduling of control tasks. *Real-Time Syst.* **23**: p 25–53.
- Chang, C.-N., Cheng, H.-B. and Chao, A.C., 2004. Applying the Nernst

- Equation To Simulate Redox Potential Variations for Biological Nitrification and Denitrification Processes. *Environ. Sci. Technol.* **38**: p 1807–1812.
- Charnnok, B., Suksaroj, T., Boonswang, P. and Chaiprapat, S., 2013. Oxidation of hydrogen sulfide in biogas using dissolved oxygen in the extreme acidic biofiltration operation. *Bioresour. Technol.* **131**: p 492–499.
- Cho, K.-S., Hirai, M. and Shoda, M., 1991. Degradation characteristics of hydrogen sulfide, methanethiol, dimethyl sulfide and dimethyl disulfide by *Thiobacillus thioparus* DW44 isolated from peat biofilter. *J. Ferment. Bioeng.* **71**, 384–389.
- Chotteau, V. and Hjalmarsson, H., 2009. Tuning of Dissolved Oxygen and pH PID Control Parameters in Large Scale Bioreactor by Lag Control. Proceedings of the 21st Annual Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT), Dublin, Ireland.
- Chung, Y., Lin, Y. and Tseng, C., 2004. Control of H₂S waste gas emissions with a biological activated carbon filter. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **79**: p 570–577.
- Chynoweth, D.P., Owens, J.M. and Legrand, R., 2001. Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. *Renew. Energy* **22**, 1–8.
- Clesceri, L.S., Greenberg, A.E. and Eaton, A.D., 1999. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington, DC, USA.
- Cominos, P. and Munro, N., 2002. PID controllers: recent tuning methods and design to specification. *IEE Proceedings-Control Theory Appl.* **149**: p 46–53.
- Custódio, L., Ventura, R. and Pinto-Ferreira, C., 1999. Artificial emotions and emotion-based control systems, in: *Emerging Technologies and Factory Automation*. 7th IEEE International Conference on. IEEE: p. 1415–1420.
- Cytryn, E., Minz, D., Gelfand, I., Neori, A., Gieseke, A., de Beer, D. and van Rijn, J., 2005. Sulfide-oxidizing activity and bacterial community structure in a fluidized bed reactor from a zero-discharge mariculture system. *Environ. Sci. Technol.* **39**: p 1802–1810.

Datta, A., Ho, M., Ho and Bhattacharyya, S.P., 2013. Structure and

- synthesis of PID controllers. Springer-Verlag London Ltd.
- de Arespachaga, N., Valderrama, C., Mesa, C., Bouchy, L. and Cortina, J.L., 2014. Biogas biological desulphurisation under extremely acidic conditions for energetic valorisation in Solid Oxide Fuel Cells. *Chem. Eng. J.* **255**: p 677–685.
- de Arespachaga, N., Valderrama, C., Mesa, C., Bouchy, L. and Cortina, J.L.L., 2014. Biogas deep clean-up based on adsorption technologies for Solid Oxide Fuel Cell applications. *Chem. Eng. J.* **255**: p 593–603.
- Dechy, N., Bourdeaux, T., Ayrault, N., Kordek, M.-A. and Le Coze, J.-C., 2004. First lessons of the Toulouse ammonium nitrate disaster, 21st September 2001, AZF plant, France. *J. Hazard. Mater.* **111**: p 131–138.
- Deshusses, M.A., 1997. Biological waste air treatment in biofilters. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**: p 335–339.
- Detlef Kluëber, H. and Conrad, R., 1998. Inhibitory effects of nitrate, nitrite, NO and N₂O on methanogenesis by *Methanosarcina barkeri* and *Methanobacterium bryantii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**: p 331–339.
- Díaz, I., Pérez, S.I., Ferrero, E.M. and Fdz-Polanco, M., 2011. Effect of oxygen dosing point and mixing on the microaerobic removal of hydrogen sulphide in sludge digesters. *Bioresour. Technol.* **102**: p 3768–3775.
- DiBiasio, D., Lim, H.C. and Weigand, W.A., 1981. An experimental investigation of stability and multiplicity of steady states in a biological reactor. *AIChE J.* **27**: p 284–292.
- Duan, H., Koe, L.C.C. and Yan, R., 2005. Treatment of H₂S using a horizontal biotrickling filter based on biological activated carbon: reactor setup and performance evaluation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**: p 143–149.
- E**riksson, L.M. and Johansson, M., 2007. PID Controller Tuning Rules for Varying Time-Delay Systems. American Control Conference, 2007. ACC '07, New York, USA.
- Estrada, J.M., Kraakman, N.J.R. (Bart), Lebrero, R. and Muñoz, R., 2012. A sensitivity analysis of process design parameters, commodity prices and robustness on the economics of odour abatement

technologies. *Biotechnol. Adv.* **30**: p 1354–1363.

Faure, A., York, P. and Rowe, R.C., 2001. Process control and scale-up of pharmaceutical wet granulation processes: a review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **52**: p 269–277.

Fernández, M., 2011. Thesis: Desulfuración de biogás en condiciones anóxicas mediante biofiltración. Universidad de Cadiz. Spain.

Fernández, M., Ramírez, M., Gómez, J.M. and Cantero, D., 2014. Biogas biodesulfurization in an anoxic biotrickling filter packed with open-pore polyurethane foam. *J. Hazard. Mater.* **264**: p 529–535.

Fernández, M., Ramírez, M., Pérez, R.M., Gómez, J.M. and Cantero, D., 2013. Hydrogen sulphide removal from biogas by an anoxic biotrickling filter packed with Pall rings. *Chem. Eng. J.* **225**: p 456–463.

Flood, B.E., Jones, D.S. and Bailey, J. V., 2015. *Sedimenticola thiotaurini* sp. nov., a sulfur-oxidizing bacterium isolated from salt marsh sediments, and emended descriptions of the genus *Sedimenticola* and *Sedimenticola selenatireducens*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**: p 2522–2530.

Fortuny, M., Gamisans, X., Deshusses, M.A., Lafuente, J., Casas, C. and Gabriel, D., 2011. Operational aspects of the desulfurization process of energy gases mimics in biotrickling filters. *Water Res.* **45**: p 5665–5674.

Friedrich, M., Springer, N., Ludwig, W., and Schink, B., 1996. Phylogenetic Positions of *Desulfofustis glycolicus* gen. nov., sp. nov. and *Syntrophobotulus glycolicus* gen. nov., sp. nov., Two New Strict Anaerobes Growing with Glycolic Acid. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: p 1065–1069.

García de Lomas, J., Corzo, A., Gonzalez, J.M., Andrades, J.A., Iglesias, E. and Montero, M.J., 2006. Nitrate promotes biological oxidation of sulfide in wastewaters: Experiment at plant-scale. *Biotechnol. Bioeng.* **93**: p 801–811.

Gaudin, F., Andres, Y. and Le Cloirec, P., 2008. Packing material formulation for odorous emission biofiltration. *Chemosphere* **70**: p 958–966.

Gharasoo, M., Centler, F., Van Cappellen, P., Wick, L.Y. and Thullner,

- M., 2015. Kinetics of substrate biodegradation under the cumulative effects of bioavailability and self-inhibition. *Environ. Sci. Technol.* **49**: p 5529–5537.
- Glass, C., Silverstein, J. and Oh, J., 1997. Inhibition of denitrification in activated sludge by nitrite. *Water Environ. Res.* **69**: p 1086–1093.
- Gray, J.S., 2000. The measurement of marine species diversity, with an application to the benthic fauna of the Norwegian continental shelf. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **250**: p 23–49.
- Gray, M., McQuarrie, J., Kestel, S., Phillips, H. and Stahl, T., 2012. Implementation and Results of a Feed-Forward Process Controller. *Proceedings of the Water Environment Federation, New Orleans, USA*: p 5622–5641.
- Greene, E.A., Hubert, C., Nemati, M., Jenneman, G.E. and Voordouw, G., 2003. Nitrite reductase activity of sulphate-reducing bacteria prevents their inhibition by nitrate-reducing, sulphide-oxidizing bacteria. *Environ. Microbiol.* **5**: p 607–617.
- Gude, J.J., Kahoraho, E., 2012. Kappa-tau type PI tuning rules for specified robust levels. *IFAC Proc. Vol.* **45**: p 589–594.
- Hägglund, T. and Åström, K.J., 2002. Revisiting The Ziegler-Nichols Tuning Rules For Pi Control. *Asian Journal of Control* **4**: p364–380.
- Hang, C.C., Astrom, K.J. and Ho, W.K., 1991. Refinements of the Ziegler-Nichols tuning formula. *IEE Proc. D - Control Theory Appl.* **138**:p 111-118.
- Hang, C.C. and Sin, K.K., 1991. A comparative performance study of PID auto-tuners. *IEEE Control Syst.* **11**: p 41–47.
- Hernández, J., Lafuente, J., Prado, Ó.J. and Gabriel, D., 2013. Startup and long-term performance of biotrickling filters packed with polyurethane foam and poplar wood chips treating a mixture of ethylmercaptan, H₂S, and NH₃. *J. Air Waste Manage. Assoc.* **63**: p 462–471.
- Holm-Nielsen, J.B., Al Seadi, T. and Oleskowicz-Popiel, P., 2009. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresour. Technol.* **100**:p 5478–5484.
- Hu, J.Y., Ong, S.L., Ng, W.J., Lu, F. and Fan, X.J., 2003. A new method for characterizing denitrifying phosphorus removal bacteria by using

- three different types of electron acceptors. *Water Res.* **37**: p 3463–71.
- Huang, R., Li, D., Li, X., Bao, L., Jiang, A. and Zhang, J., 2007. Positive role of nitrite as electron acceptor on anoxic denitrifying phosphorus removal process. *Chinese Sci. Bull.* **52**: p 2179–2183.
- Hvitved-Jacobsen, T., Vollertsen, J. and Nielsen, A.H., 2013. *Sewer processes: microbial and chemical process engineering of sewer networks*. CRC press, Boca Raton, USA.
- Ingham, J., Dunn, I.J., Heinzle, E., Prenosil, J.E., Snape, J.B., 2008. *Chemical engineering dynamics: an introduction to modelling and computer simulation*. John Wiley & Sons, Weinheim, Germany.
- J**anssen, A.J.H., Meijer, S., Bontsema, J. and Lettinga, G., 1998. Application of the redox potential for controlling a sulfide oxidizing bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **60**: p 147–155.
- Jeníček, P., Horejš, J., Pokorná-Krayzelová, L., Bindzar, J. and Bartáček, J., 2017. Simple biogas desulfurization by microaeration – Full scale experience. *Anaerobe*, Accepted Manuscript.
- Jiang, G., Gutierrez, O. and Yuan, Z., 2011. The strong biocidal effect of free nitrous acid on anaerobic sewer biofilms. *Water Res.* **45**: p3735–3743.
- Jin, Y., Veiga, M.C. and Kennes, C., 2005. Effects of pH, CO₂, and flow pattern on the autotrophic degradation of hydrogen sulfide in a biotrickling filter. *Biotechnol. Bioeng.* **92**: p 462–71.
- Jing, C., Ping, Z. and Mahmood, Q., 2010. Influence of various nitrogenous electron acceptors on the anaerobic sulfide oxidation. *Bioresour. Technol.* **101**, 2931–2937.
- Johnson, G W; Jennings, R., 2006. *LabVIEW graphical programming*. McGraw-hill New York, USA.
- Jørgensen, B.B., Fossing, H., Wirsén, C.O. and Jannasch, H.W., 1991. Sulfide oxidation in the anoxic Black Sea chemocline. *Deep Sea Res. Part A. Oceanogr. Res. Pap.* **38**: p S1083–S1103.
- K**adam, R., and Panwar, N.L., 2017. Recent advancement in biogas enrichment and its applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **73**: p 892–903.
- Kasimir-Klemedtsson, Å., Klemedtsson, L., Berglund, K., Martikainen, P.,

- Silvola, J. and Oenema, O., 1997. Greenhouse gas emissions from farmed organic soils: a review. *Soil use Manag.* **13**: p 245–250.
- Kelly, D.P. and Wood, A.P., 2006. The Chemolithotrophic Prokaryotes, in: *The Prokaryotes: Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry*. Springer New York, USA: p. 441–456.
- Keylock, C.J., 2005. Simpson diversity and the Shannon–Wiener index as special cases of a generalized entropy. *Oikos* **109**: p 203–207.
- Khanal, S.K. and Huang, J.-C., 2003. ORP-based oxygenation for sulfide control in anaerobic treatment of high-sulfate wastewater. *Water Res.* **37**: p 2053–2062.
- Kleerebezem, R. and Mendez, R., 2002. Autotrophic denitrification for combined hydrogen sulfide removal from biogas and post-denitrification. *Water Sci. Tech.* **45**: p 349–356.
- Kodama, Y. and Watanabe, K., 2003. Isolation and Characterization of a Sulfur-Oxidizing Chemolithotroph Growing on Crude Oil under Anaerobic Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: p 107–112.
- Kramer, K.E., Rose-Pehrsson, S.L., Hammond, M.H., Tillett, D. and Streckert, H.H., 2007. Detection and classification of gaseous sulfur compounds by solid electrolyte cyclic voltammetry of cermet sensor array. *Anal. Chim. Acta* **584**: p 78–88.
- Krishnakumar, B. and Manilal, V.B., 1999. Bacterial oxidation of sulphide under denitrifying conditions. *Biotechnol. Lett.* **21**: p 437–440.
- Lafita, C., Peña-Roja, J.M., Sempere, F., Waalkens, A. and Gabaldón, C., 2012. Hydrogen sulfide and odor removal by field-scale biotrickling filters: Influence of seasonal variations of load and temperature. *J. Environ. Sci. Heal. Part A* **47**: p 970–978.
- Lebrero, R., Rodríguez, E., Estrada, J.M., García-Encina, P.A., Muñoz, R., 2012. Odor abatement in biotrickling filters: effect of the EBRT on methyl mercaptan and hydrophobic VOCs removal. *Bioresour. Tech.* **109**: p 38–45.
- Lebrero, R., Rodríguez, E., García-Encina, P.A. and Muñoz, R., 2011. A comparative assessment of biofiltration and activated sludge diffusion for odour abatement. *J. Hazard. Mater.* **190**: p 622–630.
- Lebrero, R., Toledo-Cervantes, A., Muñoz, R., del Nery, V. and Foresti, E., 2015. Biogas upgrading from vinasse digesters: A comparison

- between an anoxic biotrickling filter and an algal-bacterial photobioreactor. J. Chem. Technol. Biotechnol. **91**: p 2488-2495.
- Lee, E.Y., Lee, N.Y., Cho, K.-S. and Ryu, H.W., 2006. Removal of hydrogen sulfide by sulfate-resistant *Acidithiobacillus thiooxidans* AZ11. J. Biosci. Bioeng. **101**: p 309–314.
- Lee, J., Lee, S.Y., Park, S. and Middelberg, A.P.J., 1999. Control of fed-batch fermentations. Biotechnol. Adv. **17**, 29–48.
- Lee, K.-C. and Rittmann, B.E., 2003. Effects of pH and precipitation on autohydrogenotrophic denitrification using the hollow-fiber membrane-biofilm reactor. Water Res. **37**: p 1551–1556.
- Lee, S.C., Hwang, Y.B., Chang, H.N. and Chang, Y.K., 1991. Adaptive control of dissolved oxygen concentration in a bioreactor. Biotechnol. Bioeng. **37**: p 597–607.
- Levine, W.S., 1996. The Control Handbook. CRC Press. Boca Raton, USA.
- Li, X., Jiang, X., Zhou, Q. and Jiang, W., 2016. Effect of S/N Ratio on the Removal of Hydrogen Sulfide from Biogas in Anoxic Bioreactors. Appl. Biochem. Biotechnol. **180**: p 930–944.
- Lie, T.J., Clawson, M.L., Godchaux, W. and Leadbetter, E.R., 1999. Sulfidogenesis from 2-Aminoethanesulfonate (Taurine) Fermentation by a Morphologically Unusual Sulfate-Reducing Bacterium, *Desulforhopalus singaporensis* sp. nov. App. Environ. Microbiol. **65**: p 3328–3334.
- Lipták, B.G., 2006. Instrument engineers' handbook. Process control. CRC Press. Boca Raton, USA.
- Liserre, M., Sauter, T. and Hung, J.Y., 2010. Future energy systems: Integrating renewable energy sources into the smart power grid through industrial electronics. IEEE Ind. Electron. Mag. **4**: p 18–37.
- Liu, G.P. and Daley, S., 2001. Optimal-tuning PID control for industrial systems. Control Eng. Pract. **9**: p 1185–1194.
- Lohwacharin, J. and Annachhatre, A.P., 2010. Biological sulfide oxidation in an airlift bioreactor. Bioresour. Technol. **101**, 2114–2120.
- López, L.R., Bezerra, T., Mora, M., Lafuente, J. and Gabriel, D., 2016. Influence of trickling liquid velocity and flow pattern in the improvement of oxygen transport in aerobic biotrickling filters for

- biogas desulfurization. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **91**: p 1031–1039.
- López, L.R., Mora, M., Van der Heyden, C., Volcke, E., Baeza, J.A., Lafuente, J. and Gabriel, D., 2016b. Application of feedback and feedforward control strategies in aerobic biotrickling filters for biogas desulfurization. In: 1st International Conference on Bioenergy & Climate Change: Towards a Sustainable Development. Soria, Spain.
- López, L.R., 2016. Thesis: Development and application of control strategies in an aerobic biotrickling filter for H₂S removal from biogas streams: experimental and modelling study. UAB, Spain.
- Luther, G.W., Findlay, A., MacDonald, D., Owings, S., Hanson, T., Beinart, R. and Girguis, P., 2011. Thermodynamics and Kinetics of Sulfide Oxidation by Oxygen: A Look at Inorganically Controlled Reactions and Biologically Mediated Processes in the Environment. *Front. Microbiol.* **2**: p 1–9.
- M**adigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J., 2015. Brock biology of microorganisms. prentice hall Upper Saddle River, New Jersey, USA.
- Maestre, J.P., Rovira, R., Álvarez-Hornos, F.J., Fortuny, M., Lafuente, J., Gamisans, X. and Gabriel, D., 2010. Bacterial community analysis of a gas-phase biotrickling filter for biogas mimics desulfurization through the rRNA approach. *Chemosphere* **80**: p 872–880.
- Mahmood, Q., Zheng, P., Cai, J., Wu, D., Hu, B., Islam, E. and Rashid Azim, M., 2007a. Comparison of anoxic sulfide biooxidation using nitrate/nitrite as electron acceptor. *Environ. Prog.* **26**, 169–177.
- Mahmood, Q., Zheng, P., Cai, J., Wu, D., Hu, B. and Li, J., 2007b. Anoxic sulfide biooxidation using nitrite as electron acceptor. *J. Hazard. Mater.* **147**: p 249–256.
- Mahmood, Q., Zheng, P., Hayat, Y., Islam, E., Wu, D. and Ren-Cun, J., 2008. Effect of pH on anoxic sulfide oxidizing reactor performance. *Bioresour. Technol.* **99**: p 3291–3296.
- McNevin, D. and Barford, J., 2000. Biofiltration as an odour abatement strategy. *Biochem. Eng. J.* **5**: p 231–242.
- Mendonça, T. and Lago, P., 1998. PID control strategies for the automatic control of neuromuscular blockade. *Control Eng. Pract.* **6**: p 1225–

1231.

- Millero, F.J., Hubinger, S., Fernandez, M. and Garnett, S., 1987. Oxidation of H₂S in seawater as a function of temperature, pH, and ionic strength. *Environ. Sci. Technol.* **21**: p 439–443.
- Mohseni, M., 2005. Biological Treatment of Waste Gases Containing Inorganic Compounds, in: Shareefdeen, Z. and Singh, A. (Eds.), *Biotechnology for Odor and Air Pollution Control*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Germany: p 253–279.
- Montebello, A.M., Baeza, M., Lafuente, J., Gabriel, D., 2010. Monitoring and performance of a desulphurizing biotrickling filter with an integrated continuous gas/liquid flow analyser. *Chem. Eng. J.* **165**: p 500–507.
- Montebello, A.M., Fernández, M., Almenglo, F., Ramírez, M., Cantero, D., Baeza, M. and Gabriel, D., 2012. Simultaneous methylmercaptan and hydrogen sulfide removal in the desulfurization of biogas in aerobic and anoxic biotrickling filters. *Chem. Eng. J.* **200–202**: p 237–246.
- Montebello, A.M., Mora, M., López, L.R., Bezerra, T., Gamisans, X., Lafuente, J., Baeza, M. and Gabriel, D., 2014. Aerobic desulfurization of biogas by acidic biotrickling filtration in a randomly packed reactor. *J. Hazard. Mater.* **280**: p 200–208.
- Mora, M., Fernández, M., Gómez, J.M., Cantero, D., Lafuente, J., Gamisans, X. and Gabriel, D., 2014. Kinetic and stoichiometric characterization of anoxic sulfide oxidation by SO-NR mixed cultures from anoxic biotrickling filters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**: p 77–87.
- Moraes, B.S., Souza, T.S.O. and Foresti, E., 2012. Effect of sulfide concentration on autotrophic denitrification from nitrate and nitrite in vertical fixed-bed reactors. *Process Biochem.* **47**: p 1395–1401.
- Munz, G., Mannucci, A., Arreola-Vargas, J., Alatríste-Mondragon, F., Giaccherini, F. and Mori, G., 2015. Nitrite and nitrate as electron acceptors for biological sulphide oxidation. *Wat. Sci. Tech.* **72**, 593–599.
- Muñoz, R., Meier, L., Diaz, I. and Jeison, D., 2015. A review on the state-of-the-art of physical/chemical and biological technologies for biogas upgrading. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* **14**, 727–759.

- Murray, A.E., Preston, C.M., Massana, R., Taylor, L.T., Blakis, A., Wu, K. and DeLong, E.F., 1998. Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: p 2585–2595.
- Muyzer, G., de Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: p 695–700.
- N**agel, F.J.I., Tramper, J., Bakker, M.S.N. and Rinzema, A., 2001. Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **72**: p 219–230.
- Nallathambi Gunaseelan, V., 1997. Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review. *Biomass and Bioenergy* **13**: p 83–114.
- Namini, M.T., Heydarian, S.M., Bonakdarpour, B. and Farjah, A., 2008. Removal of H₂S from synthetic waste gas streams using a biotrickling filter. *Iran. J. Chem. Eng.* **5**, 40–51.
- National Energy Tecnology Laboratory. EG&G Technical Services, I., 2004. Fuel cell handbook, Seventh Ed. U.S. Dept. of Energy, Office of Fossil Energy, National Energy Technology Laboratory, Morgantown, WV, USA.
- Nikolcheva, L.G., Bourque, T. and Bärlocher, F., 2005. Fungal diversity during initial stages of leaf decomposition in a stream. *Mycol. Res.* **109**: p 246–253.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., Kühl, M. and Muyzer, G., 1999. Quantifying Microbial Diversity: Morphotypes, 16S rRNA Genes, and Carotenoids of Oxygenic Phototrophs in Microbial Mats. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 422–430.
- O**gata, K., 2010. Modern control engineering. Prentice Hall, New Jersey, USA.
- P**acek, L., Svehla, P., Bartacek, J., Radechovsky, J., Hrnčirova, H., Shejbalova, S., Balik, J. and Jenicek, P., 2015. Direct and indirect effects of oxygen limitation on nitrification process applied to reject

- water treatment. *Desalin. Water Treat.* **56**: p 598–607.
- Papurello, D., Borchiellini, R., Bareschino, P., Chiodo, V., Freni, S., Lanzini, A., Pepe, F., Ortigoza, G.A. and Santarelli, M., 2014. Performance of a Solid Oxide Fuel Cell short-stack with biogas feeding. *Appl. Energy* **125**: p 254–263.
- Papurello, D., Soukoulis, C., Schuhfried, E., Cappellin, L., Gasperi, F., Silvestri, S., Santarelli, M. and Biasioli, F., 2012. Monitoring of volatile compound emissions during dry anaerobic digestion of the Organic Fraction of Municipal Solid Waste by Proton Transfer Reaction Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Bioresour. Technol.* **126**, 254–265.
- Park, J.H., Sung, S.W. and Lee, I.-B., 1998. An Enhanced PID Control Strategy for Unstable Processes. *Automatica* **34**: p 751–756.
- Peng, Y.Z., Chen, Y., Peng, C.Y., Liu, M., Wang, S.Y., Song, X.Q. and Cui, Y.W., 2004. Nitrite accumulation by aeration controlled in sequencing batch reactors treating domestic wastewater. *Water Sci. Technol.* **50**: p 35–43.
- Perry, R.H. and Green, D.W., 2008. *Perry's chemical engineers' handbook*. McGraw-hill New York, USA.
- Petersson, A. and Wellinger, A., 2009. Biogas upgrading technologies—developments and innovations. *IEA Bioenergy* 12–15.
- Poizot, P. and Dolhem, F., 2011. Clean energy new deal for a sustainable world: from non-CO₂ generating energy sources to greener electrochemical storage devices. *Energy Environ. Sci.* **4**: p 2003–2019.
- Pokorna, D. and Zabranska, J., 2015. Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology. *Biotechnol. Adv.* **10**: 41–46.
- Pramod, S. and Chidambaram, M., 2000. Closed loop identification of transfer function model for unstable bioreactors for tuning PID controllers. *Bioprocess Eng.* **22**: p 185–188.
- Prescott, M.L., Harley, P.J. and Klein, D.A., 2002. *Microbiology*, 5th edition. New York, USA.
- R**ajinikanth, V. and Latha, K., 2010. Identification and control of unstable biochemical reactor. *Int. J. Chem. Eng. Appl.* **1**, 106–111.
- Ramírez, M., Fernández, M., Granada, C., Le Borgne, S., Gómez, J.M. and

- Cantero, D., 2011. Biofiltration of reduced sulphur compounds and community analysis of sulphur-oxidizing bacteria. *Bioresour. Technol.* **102**, 4047–4053.
- Ramírez, M., Gómez, J.M. and Cantero, D., 2015. Biogas: Sources, Purification and Uses, in: Sharma, U.C., Kumar, S., Prasad, R. and Govil, J.N. (Eds.), *Hydrogen and Other Technologies*. Studium Press LLC, USA, pp. 296–323.
- Ramos, I. and Fdz-Polanco, M., 2014. Microaerobic control of biogas sulphide content during sewage sludge digestion by using biogas production and hydrogen sulphide concentration. *Chem. Eng. J.* **250**: p 303–311.
- Ramos, I., Pérez, R. and Fdz-Polanco, M., 2013. Microaerobic desulphurisation unit: A new biological system for the removal of H₂S from biogas. *Bioresour. Technol.* **142**: p 633–640.
- Redondo, R., Machado, V., Baeza, M., Lafuente, J. and Gabriel, D., 2008. On-line monitoring of gas-phase bioreactors for biogas treatment: hydrogen sulfide and sulfide analysis by automated flow systems. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**: p 789–798.
- Rieger, L., Jones, R.M., Dold, P.L. and Bott, C.B., 2014. Ammonia-Based Feedforward and Feedback Aeration Control in Activated Sludge Processes. *Water Environ. Res.* **86**: p 63–73.
- Rivera, D.E., Morari, M. and Skogestad, S., 1986. Internal model control: PID controller design. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* **25**: p 252–265.
- Rodriguez, G., Dorado, A.D., Bonsfills, A., Sanahuja, R., Gabriel, D. and Gamisans, X., 2012. Optimization of oxygen transfer through venturi-based systems applied to the biological sweetening of biogas. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **87**: p 854–860.
- Rodriguez, G., Dorado, A.D., Fortuny, M., Gabriel, D. and Gamisans, X., 2014. Biotrickling filters for biogas sweetening: Oxygen transfer improvement for a reliable operation. *Process Saf. Environ. Prot.* **92**: p 261–268.
- Ruiz, G., Jeison, D., Rubilar, O., Ciudad, G. and Chamy, R., 2006. Nitrification–denitrification via nitrite accumulation for nitrogen removal from wastewaters. *Bioresour. Technol.* **97**: p 330–335.
- Russ, L., Speth, D.R., Jetten, M.S.M., Op den Camp, H.J.M. and Kartal, B.,

2014. Interactions between anaerobic ammonium and sulfur-oxidizing bacteria in a laboratory scale model system. *Environ. Microbiol.* **16**: p 3487–3498.
- Ryckebosch, E., Drouillon, M. and Vervaeren, H., 2011. Techniques for transformation of biogas to biomethane. *Biomass and Bioenergy* **35**: p 1633–1645.
- Sander, R., 1999. Compilation of Henry's law constants for inorganic and organic species of potential importance in environmental chemistry.
- Schieder, D., Quicker, P., Schneider, R., Winter, H., Prechtel, S. and Faulstich, M., 2003. Microbiological removal of hydrogen sulfide from biogas by means of a separate biofilter system: Experience with technical operation. *Water Sci. Technol.* **48**: p 209–212.
- Seborg, D.E., Mellichamp, D.A., Edgar, T.F. and Doyle III, F.J., 2010. *Process dynamics and control*. John Wiley & Sons. New Jersey, USA.
- Serejo, M.L., Posadas, E., Boncz, M.A., Blanco, S., García-Encina, P. and Muñoz, R., 2015. Influence of biogas flow rate on biomass composition during the optimization of biogas upgrading in microalgal-bacterial processes. *Environ. Sci. Technol.* **49**: p 3228–3236.
- Shahrokhi, M., Zomorodi, A., 2013. Comparison of PID controller tuning methods. Department of Chemical & Petroleum Engineering Sharif University of Technology. Tehran, Iran.
- Sievert, S.M., Scott, K.M., Klotz, M.G., Chain, P.S.G., Hauser, L.J., Hemp, J., Hügler, M., Land, M., Lapidus, A., Larimer, F.W., Lucas, S., Malfatti, S.A., Meyer, F., Paulsen, I.T., Ren, Q., Simon, J. and Class, the U.S.F.G., 2008. Genome of the Epsilonproteobacterial Chemolithoautotroph *Sulfurimonas denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: p 1145–1156.
- Sikorski, J., Munk, C., Lapidus, A., Ngatchou Djao, O.D., Lucas, S., Glavina Del Rio, T., Nolan, M., Tice, H., Han, C., Cheng, J.-F., Tapia, R., Goodwin, L., Pitluck, S., Liolios, K., Ivanova, N., Mavromatis, K., Mikhailova, N., Pati, A., Sims, D., Meincke, L., Brettin, T., Detter, J.C., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y.-J., Jeffries, C.D., Rohde, M., Lang, E., Spring, S., Göker, M., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J.A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N.C. and Klenk, H.-P., 2010. Complete

- genome sequence of *Sulfurimonas autotrophica* type strain (OK10(T)). Stand. Genomic Sci. **3**: p 194–202.
- Silva, G.J., Datta, A., Bhattacharyya, S.P., 2003. On the stability and controller robustness of some popular PID tuning rules. IEEE Trans. Automat. Contr. **48**: p 1638–1641.
- Smith, C.A., Corripio, A.B., 1985. Principles and practice of automatic process control. Wiley New York, USA.
- Solcia, R.B.B., Ramírez, M., Fernández, M., Cantero, D. and Bevilaqua, D., 2014. Hydrogen sulphide removal from air by biotrickling filter using open-pore polyurethane foam as a carrier. Biochem. Eng. J. **84**: p 1–8.
- Solera, R., Romero, L.I. and Sales, D., 2001. Measurement of microbial numbers and biomass contained in thermophilic anaerobic reactors. Water Environ. Res. **73**: p 684–690.
- Song, J. and Kinney, K.A., 2000. Effect of vapor-phase bioreactor operation on biomass accumulation, distribution, and activity: Linking biofilm properties to bioreactor performance. Biotechnol. Bioeng. **68**: p 508–516.
- Soreanu, G., Béland, M., Falletta, P., Edmonson, K. and Seto, P., 2008a. Investigation on the use of nitrified wastewater for the steady-state operation of a biotrickling filter for the removal of hydrogen sulphide in biogas. J. Environ. Eng. Sci. **7**: p 543–552.
- Soreanu, G., Béland, M., Falletta, P., Edmonson, K. and Seto, P., 2008b. Laboratory pilot scale study for H₂S removal from biogas in an anoxic biotrickling filter. Water Sci. Technol. **57**: p 201–207.
- Soreanu, G., Béland, M., Falletta, P., Ventresca, B. and Seto, P., 2009. Evaluation of different packing media for anoxic H₂S control in biogas. Env. Technol. **30**: p 1249–1259.
- Spellerberg, I.F., 2008. Shannon–Wiener index. Lincoln University, Lincoln, New Zealand.
- Stambouli, A.B.B. and Traversa, E., 2002. Solid oxide fuel cells (SOFCs): a review of an environmentally clean and efficient source of energy. Renew. Sustain. Energy Rev. **6**: p 433–455.
- Stephanopoulos, G., 1984. Chemical process control: an introduction to theory and practice. Prentice Hall, New Jersey, USA.

- Sublette, K.L. and Sylvester, N.D., 1987. Oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacillus denitrificans*: Desulfurization of natural gas. *Biotechnol. Bioeng.* **29**: p 249–257.
- Sun, F., Sun, B., Li, Q., Deng, X., Hu, J. and Wu, W., 2014. Pilot-scale nitrogen removal from leachate by ex situ nitrification and in situ denitrification in a landfill bioreactor. *Chemosphere* **101**: p 77–85.
- Syed, M., Soreanu, G., Falletta, P. and Béland, M., 2006. Removal of hydrogen sulfide from gas streams using biological processes. A review. *Can. Biosyst. Eng.* **48**: p 2.1–2.12.
- Takai, K., Suzuki, M., Nakagawa, S., Miyazaki, M., Suzuki, Y., Inagaki, F. and Horikoshi, K., 2006. *Sulfurimonas paralvinellae* sp. nov., a novel mesophilic, hydrogen- and sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the *Epsilonproteobacteria* isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete nest, reclassification of *Thiomicrospira denitrificans* as Sul. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **56**: p 1725–1733.
- Tang, K., Baskaran, V. and Nemati, M., 2009. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochem. Eng. J.* **44**: p 73–94.
- Thomsen, J.K., Geest, T. and Cox, R.P., 1994. Mass Spectrometric Studies of the Effect of pH on the Accumulation of Intermediates in Denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: p 536–541.
- Tomàs, M., Fortuny, M., Lao, C., Gabriel, D., Lafuente, J. and Gamisans, X., 2009. Technical and economical study of a full-scale biotrickling filter for H₂S removal from biogas. *Water Pract. Technol.* **4**.
- Tóth, G., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K., Vozik, D. and Bakonyi, P., 2015. Degradation of hydrogen sulfide by immobilized *Thiobacillus thioparus* in continuous biotrickling reactor fed with synthetic gas mixture. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **105**: p 185–191.
- Trogisch, S., Hoffmann, J. and Daza Bertrand, L., 2005. Operation of molten carbonate fuel cells with different biogas sources: A challenging approach for field trials. *J. Power Sources* **145**: p 632–638.
- Turker, M., Baspinar, A.B. and Hocalar, A., 2012. Monitoring and control of biogas desulphurization using oxidation reduction potential under

denitrifying conditions. Journal of Chemical Technology & Biotechnology **87**:p 682–688.

- V**ilanova, R., Alfaro, V.M., Arrieta, O. and Pedret, C., 2010. Analysis of the claimed robustness for PI/PID robust tuning rules. Control & Automation (MED), in: 18th Mediterranean Conference on Control and Automation, Marrakech, Morocco.
- Visioli, A., 2006. Practical PID control. Int. J. Robust Nonlinear Control **19**, 1076–1078.
- von Meien, O.F., Luz Jr, L.F.L., Mitchell, D.A., Ricardo Pérez-Correa, J., Agosin, E., Fernández-Fernández, M. and Arcas, J.A., 2004. Control strategies for intermittently mixed, forcefully aerated solid-state fermentation bioreactors based on the analysis of a distributed parameter model. Chem. Eng. Sci. **59**: p 4493–4504.
- W**alsh, J., Ross, C., Smith, M., Harper, S. and Wilkins, W., 1988. Handbook on Biogas Utilization, Georgia Institute of Technology, Atlanta, USA.
- Walsh, J.L.L., Ross, C.C.C., Smith, M.S.S. and Harper, S.R.R., 1989. Utilization of biogas. Biomass **20**: p 277–290.
- Weiland, P., 2003. Production and energetic use of biogas from energy crops and wastes in Germany. Appl. Biochem. Biotechnol. **109**: p 263–274.
- Weon, H.Y., Kim, B.Y., Lee, C.M., Hong, S.B., Jeon, Y.A., Koo, B.S. and Kwon, S.W., 2009. *Solitalea koreensis* gen. nov., sp. nov. and the reclassification of [*Flexibacter*] canadensis as *Solitalea canadensis* comb. nov. nt. J. Syst. Evol. Microbiol. **59**: p 1969–1975.
- Svrcek, W.Y., Mahoney, D.P. and Young, B.R., 2014. A Real-Time Approach to Process Control, Third Edition. John Wiley & Sons, Ltd, UK.
- Willis, M.J., 1999. Proportional-Integral-Derivative Control. Dept. of Chemical and Process Engineering University of Newcastle, UK.
- Y**ang, W., Lu, H., Khanal, S.K., Zhao, Q., Meng, L. and Chen, G.-H.H., 2016. Granulation of sulfur-oxidizing bacteria for autotrophic denitrification. Water Res. **104**: p 507–519.
- Yentekakis, I. V. and Goula, G., 2017. Biogas Management: Advanced

- Utilization for Production of Renewable Energy and Added-value Chemicals. *Front. Environ. Sci.* **5**:7.
- Yi, T.-M., Huang, Y., Simon, M.I. and Doyle, J., 2000. Robust perfect adaptation in bacterial chemotaxis through integral feedback control. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: p 4649–4653.
- Yong, M., Yongzhen, P. and Shuying, W., 2005. Feedforward-feedback control of dissolved oxygen concentration in a predenitrification system. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **27**: p 223–228.
- Yu, C.-C., 2006. Autotuning of PID controllers: A relay feedback approach. Springer-Verlag London Limited, UK.
- Yu, J.M., Shen, G. and Sha, H., 2008. Automatic control system for purification of H₂S-contained waste gas with biotrickling filter. *J. PLA Univ. Sci. Technol. (Natural Sci. Ed.)* **9**: p 228–231.
- Yu, Z. and Morrison, M., 2004. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: p 4800–4806.
- Z**hang, L., Zhang, C., Hu, C., Liu, H., Bai, Y. and Qu, J., 2015. Sulfur-based mixotrophic denitrification corresponding to different electron donors and microbial profiling in anoxic fluidized-bed membrane bioreactors. *Water Res.* **85**: p 422–431.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. and Miller, W., 2000. A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. *J. Comput. Biol.* **7**: p 203–214.
- Zhao, H., Isaacs, S.H., Sørensen, H. and Kümmel, M., 1994. A novel control strategy for improved nitrogen removal in an alternating activated sludge process—part II. Control development. *Water Res.* **28**: p 535–542.
- Zhou, Y., Oehmen, A., Lim, M., Vadivelu, V. and Ng, W.J., 2011. The role of nitrite and free nitrous acid (FNA) in wastewater treatment plants. *Water Res.* **45**: p 4672–4682.
- Ziegler, J.G. and Nichols, N.B., 1942. Optimum Settings for Automatic Controllers. *Trans. ASME* **64**: p 759–768.
- Ziemiński, K. and Kopycki, W.J., 2016. Impact of Different Packing Materials on Hydrogen Sulfide Biooxidation in Biofilters Installed in

the Industrial Environment. *Energy Fuels* **30**: p 9386–9395.